

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391412** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.08.04

(51) Int. Cl. *C07K 16/00* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.22

(54) **СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ
ТРАНСМЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ, И КЛЕТОК, КОТОРЫЕ ИХ ПРОДУЦИРУЮТ**

(31) **63/130,044**

(32) **2020.12.23**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/064769**

(87) **WO 2022/140494 2022.06.30**

(71) Заявитель:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Чэнь Ган, Ши Эрган, Ли Вэнь-И, Сух
Дэвид, Фарр Глен, Бабб Роберт (US)**

(74) Представитель:

**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (RU)**

(57) Раскрыты способы получения клеток, которые экспрессируют антитела, которые связывают трансмембранные белки, способы создания антител из таких клеток, антитела к трансмембранным белкам и их фрагменты и нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способам получения антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывается с трансмембранным белком, основанным на применении комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок для презентирования трансмембранных белковых антигенов клеткам.

202391412

A1

A1

202391412

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ ТРАНСМЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ, И КЛЕТОК, КОТОРЫЕ ИХ ПРОДУЦИРУЮТ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета предварительной заявки на патент США № 63/130044, поданной 23 декабря 2020 г., полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0002] Перечень последовательностей в виде текстового файла с кодировкой ASCII, названный 36526_10465WO01_SequenceListing.txt, размером 30 КБ, созданный 7 декабря 2021 г. и поданный в Ведомство по патентам и товарным знакам США через EFS-Web, включен в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] Настоящее изобретение в целом относится к клеткам, экспрессирующим антитела, которые связывают трансмембранные белки, способам их создания, антителам к трансмембранным белкам и их фрагментам и к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитела. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способам получения антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывается с трансмембранным белком, основанным на применении комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок для презентирования трансмембранных белковых антигенов клеткам.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Трансмембранные белки, такие как рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), и ионные каналы являются мишенями почти половины всех одобренных FDA низкомолекулярных лекарственных средств, но до настоящего времени для терапии было одобрено незначительное количество антител. См. Santo, et al., *Nat. Rev. Drug Disc.* 16:19

(2017). Как правило, способы, используемые для скрининга антител или антителопродуцирующих клеток, были неэффективными или не позволяли получить антитела, связывающие трансмембранные белки. Например, выделение и упаковка многопроходных трансмембранных белков в носители, такие как экзосомы, вирусоподобные частицы и протеолипосомы, оставляют неопределенность в отношении того, присутствуют ли достаточные количества биологически активных белков или трансмембранных белков с правильной конформацией. Кроме того, клетки, экспрессирующие GPCR, не были очень успешными в качестве реагентов для скрининга, и небольшие пептиды, происходящие от пронизывающих мембрану трансмембранных белков, редко бывают успешными при получении соответствующих антител по причине отсутствия у них конформационного контекста. Таким образом, необходимы новые способы получения и создания антител к трансмембранным белкам.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В данном документе раскрыты способы получения антител к трансмембранным белкам, которые предусматривают использование комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок для презентирования трансмембранных белковых антигенов антителам. В способах предусмотрено использование комплексов, которые включают представляющий интерес трансмембранный белок, а также липиды и мембранные каркасные белки, обычно обнаруживаемые в мембранах встречающихся в природе клеток, для презентирования трансмембранного белка в его естественной конформации антителу. Таким образом, комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок применяют в раскрытых способах для идентификации и сбора из популяции антител (или клеток, которые экспрессируют антитело) конкретной субпопуляции антител (или клеток, которые экспрессируют антитело), которые связываются с эпитопом трансмембранного белка, который является доступным в природе, таким как, например, внеклеточный домен или его части. Следовательно, настоящие способы позволяют избежать необходимости трудоемкого скрининга, идентификации и отбора эпитоп-специфических антител посредством сайт-направленного мутагенеза и других известных методик в целях установления, распознает

ли конкретное антитело требуемую часть представляющего интерес трансмембранного белка или нет.

[0006] В одном аспекте предусмотрен способ получения антител или популяции клеток, которые экспрессируют антитело к представляющему интерес трансмембранному белку, который включает приведение в контакт популяции антителопродуцирующих клеток с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который презентирует представляющий интерес трансмембранный белок или его часть.

[0007] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение в контакт популяции антителопродуцирующих клеток с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающим в себе представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, для обеспечения связывания между трансмембранным белковым антигеном, презентированным комплексом, и антителом на поверхности клетки, и сбор связанных антителопродуцирующих клеток.

[0008] В некоторых вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток представляет собой гомогенную популяцию клеток, состоящую из клеток одного конкретного типа ткани, органа или клетки. В других вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток представляет собой гетерогенную популяцию клеток, состоящую из клеток более одного типа ткани, органа или клетки. В определенных вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток включает клетки тканевого происхождения из одного или более из селезенки, лимфатического узла, костного мозга или другого органа. В некоторых вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток включает лимфоциты. В конкретных вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток включает клетки крови. В определенных вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток включает клетки периферической крови, В-клетки, плазматические клетки, плазматические клетки видов миеломы или их комбинацию. В конкретных вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток представляет собой популяцию В-клеток. В одном варианте осуществления популяция антителопродуцирующих клеток состоит из В-клеток памяти. В одном варианте

осуществления популяция антителопродуцирующих клеток включает рекомбинантные клетки, такие как, например, гибридомы.

[0009] В некоторых вариантах осуществления способы включают получение популяции антителопродуцирующих клеток от животного. В определенных вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток получена от животного, которое продуцирует антитела к представляющему интерес трансмембранному белку после иммунизации представляющим интерес трансмембранным белком или иммуногеном, являющимся нуклеиновой кислотой, которая его кодирует. В определенных вариантах осуществления животное или иммунизированное животное представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой мышь, крысу, козу, человека, хомяка, свинью, обезьяну или морскую свинку. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее не представляет собой человека. В конкретных вариантах осуществления отличное от человека млекопитающее представляет собой мышь, крысу или козу. В конкретных вариантах осуществления млекопитающее представляет собой мышь. В другом варианте осуществления способов млекопитающее представляет собой человека, такого как, например, человек, который был подвергнут воздействию иммуногена.

[0010] В некоторых случаях животное является иммунизированным. В определенных вариантах осуществления иммунизированное животное является генетически сконструированным. Например, животное может быть генетически сконструировано таким образом, чтобы животное не экспрессировало представляющий интерес трансмембранный белок с эндогенного локуса гена. В определенных вариантах осуществления генетически сконструированное животное представляет собой отличное от человека млекопитающее, такое как, например, мышь, коза или крыса, которое содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина (IgH) и легкой цепи человеческого иммуноглобулина (IgL). В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированное животное содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина и

легкой цепи человеческого иммуноглобулина, а также не имеет эндогенного гена, кодирующего представляющий интерес трансмембранный белок. В конкретных вариантах осуществления иммунизированное генетически сконструированное животное представляет собой мышь или крысу, такую как, например, мышь VELOCIMMUNE[®], которая содержит гуманизированный локус IgH и/или гуманизированный локус легкой цепи Igk. В некоторых вариантах осуществления иммунизированное генетически сконструированное животное представляет собой мышь, которая содержит гуманизированный локус IgH и гуманизированный локус легкой цепи Igk, в котором отсутствует эндогенный ген мыши, кодирующий представляющий интерес трансмембранный белок. В одном варианте осуществления генетически сконструированная мышь, содержащая ДНК, кодирующую вариabельные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина и легкой лямбда-цепи человеческого (Igλ) иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления генетически модифицированная мышь содержит ДНК, кодирующую вариabельные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина и легкой лямбда-цепи человеческого (Igλ) иммуноглобулина, а также не имеет эндогенного гена мыши, кодирующего представляющий интерес трансмембранный белок.

[0011] В некоторых вариантах осуществления антителопродуцирующие клетки получены от животного, иммунизированного иммуногеном, являющимся представляющим интерес трансмембранным белком. В определенных вариантах осуществления животное иммунизировали нуклеиновой кислотой, кодирующей по меньшей мере часть представляющего интерес трансмембранного белка, или по меньшей мере частью представляющего интерес трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировали нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес полноразмерный трансмембранный белок. В других вариантах осуществления животное иммунизировали нуклеиновой кислотой, кодирующей часть представляющего интерес трансмембранного белка. В конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота не кодирует аминоконцевую и/или карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В других вариантах осуществления животное иммунизировали нуклеиновой

кислотой, кодирующей представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, которая заключена в носителе, способном экспрессировать нуклеиновую кислоту, таком как, например, плаزمид, вектор экспрессии, вирусоподобная частица (VLP), клетка, экзосома и липосома. В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировали представляющим интерес трансмембранным белком или его частью. В определенных вариантах осуществления животное иммунизировали представляющим интерес полноразмерным трансмембранным белком. В конкретных вариантах осуществления иммуноген, являющийся представляющим интерес трансмембранным белком, усечен и не включает аминоконцевую и/или карбоксиконцевую часть полноразмерного представляющего интерес трансмембранного белка. В определенных вариантах осуществления иммуноген, являющийся представляющим интерес трансмембранным белком или нуклеиновой кислотой, модифицирован таким образом, чтобы он включал один или более обнаруживаемых элементов, таких как метка, маркер или часть. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит обнаруживаемую метку. В конкретных вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой FLAG-метку, гистидиновую метку (His-метку), Avi-метку, BirA-метку или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления иммуноген, являющийся представляющим интерес трансмембранным белком, содержит FLAG-метку и His-метку. В конкретных вариантах осуществления обнаруживаемая метка или обнаруживаемые метки расположены на аминоконце или карбоксиконце иммуногена. В конкретных вариантах осуществления животное иммунизировали представляющим интерес трансмембранным белком или его частью, которые заключены в комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок.

[0012] В определенных вариантах осуществления животное иммунизировано нуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес химерный трансмембранный белок, содержащий часть представляющего интерес человеческого трансмембранного белка, которая функционально связана с частью отличного от человеческого гомолога представляющего интерес трансмембранного белка. Отличный от человеческого гомолог может происходить от, например, человека, шимпанзе, макаки-резуса, кролика, лошади, овцы, крысы, мыши, собаки, курицы или козы. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая

представляющий интерес химерный трансмембранный белок, также включает нуклеотидную последовательность, которая кодирует обнаруживаемый элемент, такой как, например, His-метка, FLAG-метка, Avi-метка или Bir-A-метка. В других вариантах осуществления животное иммунизировано представляющим интерес химерным трансмембранным белком или его частью, которые включают часть человеческого представляющего интерес трансмембранного белка, которая функционально связана с частью отличного от человеческого гомолога представляющего интерес трансмембранного белка. В одном варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит обнаруживаемый элемент, такой как, например, His-метка, FLAG-метка, Avi-метка или Bir-A-метка.

[0013] В некоторых случаях животное иммунизировано двумя или более иммуногенами, такими как, например, белок или пептид, последовательность нуклеиновой кислоты, такая как ДНК или РНК, модифицированный белок или кодирующая ДНК, VLP и комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающий в себе представляющий интерес трансмембранный белок или его часть.

[0014] Способы предусматривают приведение в контакт популяции антителопродуцирующих клеток с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающим в себе представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, для получения популяции антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком.

[0015] Комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок включает по меньшей мере один мембранный каркасный белок (MSP) и липиды. В некоторых вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок включает по меньшей мере один MSP и множество липидов. В определенных вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок включает по меньшей мере два или ровно два MSP. В других вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок включает три или более MSP. В некоторых случаях комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок включает

по меньшей мере один мембранный каркасный белок, такой как MSP1E3D1, MSP1D1, MSP2N3 и MSP2N2. В одном варианте осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок содержит два белка MSP1E3D1. В некоторых вариантах осуществления MSP являются одинаковыми. В других вариантах осуществления MSP в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок отличаются.

[0016] В некоторых вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок содержит по меньшей мере один меченый MSP, который включает обнаруживаемый элемент, такой как метка, маркер или часть. В конкретных вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок содержит два меченых MSP и липидный бислой. В некоторых вариантах осуществления белок MSP содержит обнаруживаемую метку, такую как флуорофор. В конкретных вариантах осуществления обнаруживаемый элемент представляет собой BirA-метку или Avi-метку, расположенную на одном или более MSP комплекса. В иллюстративных вариантах осуществления один или более MSP биотинилированы посредством химического биотинилирования MSP или посредством генетического введения Avi-метки в последовательность, кодирующую MSP.

[0017] Комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок также включает множество липидов, таких как сфинголипиды и/или фосфолипиды. Липидный бислой комплекса может состоять из одного типа липидов или нескольких типов липидов. В некоторых вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок включает липиды, которые образуют дисковидный «дискоидальный» фосфолипидный бислой вокруг мембранного(-ых) каркаса(-ых) белка(-ов). В определенных вариантах осуществления липидный бислой состоит из одного или более из следующих липидов: сфингомиелина, фосфатидилхолина и их производных. В конкретном варианте осуществления липидный бислой состоит из 1-диолеилфосфатидилхолина (DOPC), 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилхолина (POPC), 1-стеароил-2-олеилфосфатидилхолина (SOPC), фосфатидилэтаноламинов (PE), и фосфатидилсерина (PS), и фосфатидилинозитола (PI) или их комбинации. В

иллюстративном варианте осуществления липидный бислой включает множество фосфолипидов POPC.

[0018] Комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок для применения в способах также включает по меньшей мере один представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, которые презентуются популяции клеток с применением комплекса в качестве антигена, способного связываться с антителами, созданными с помощью антителопродуцирующих клеток. Представляющий интерес трансмембранный белок, презентированный с помощью комплекса, может представлять собой встречающийся в природе белок с по меньшей мере одним внеклеточным доменом и по меньшей мере одним трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок, презентированный с помощью комплекса, представляет собой белок человека. В других вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой отличный от человеческого белок, такой как белок мыши, крысы, примата, хомяка, бактериальный, вирусный белок или т. п. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок модифицирован из своей встречающейся в природе формы. Иллюстративные представляющие интерес модифицированные трансмембранные белки могут предусматривать одно или более из следующих изменений их нативной аминокислотной последовательности: замен аминокислот, делеций аминокислот, вставок аминокислот. В одном варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок модифицирован с удалением, т. е. «усечением», части трансмембранного белка, такой как, например, N-концевой и/или C-концевой домен полноразмерного белка. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок, встроенный в комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, включает стабилизирующие мутации на аминоконце, в одном или более внеклеточных петлевых доменах, одном или более трансмембранных доменах, одном или более внутриклеточных доменах, C-конце или их комбинацию. В одном варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой активируемый лигандом белок, при этом представляющий интерес трансмембранный белок изменяет конформацию в присутствии

или в отсутствие лиганда (т. е. находится в активном и неактивном состоянии). В другом варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок, встроенный в комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, представляет собой химерный белок, который включает часть человеческого представляющего интерес трансмембранного белка, которая функционально связана с частью отличного от человеческого гомолога представляющего интерес трансмембранного белка. В определенном варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок содержит обнаруживаемый элемент, такой как, например, His-метка, FLAG-метка, Avi-метка, Bir-A-метка или их комбинация. В конкретных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок, презентированный комплексом, включает His-метку и FLAG-метку.

[0019] В определенных случаях представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок GPCR, белок тетраспанин или белок ионного канала. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок GPCR, такой как, например, CCR5, ADORA2A, ADRB3, C3AR1, ADRA2A, GLP1R, CCR4, CCR8 и CXCR4. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой CCR5 или его часть. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой ADRA2A или его часть. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой ADORA2A или его часть. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой C3AR1 или его часть.

[0020] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой тетраспанин, такой как, например, TSPAN 1 — TSPAN19, TSPAN21, TSPAN23, TSPAN 31, TSPAN 32, TSPAN 33, UPK1B, PRPH2, CD151, CD53, CD37, CD82, CD63, CD81, CD9, CD82, CD63, CLND6 и CLND9. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой CD63 или его часть. В других вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок ионного

канала, такой как, например, белок потенциалзависимого ионного канала. В конкретных вариантах осуществления белок потенциалзависимого ионного канала представляет собой белок потенциалзависимого кальциевого канала или белок потенциалзависимого калиевого канала. В некоторых вариантах осуществления белок ионного канала представляет собой белок активируемого кальцием калиевого канала, белок натриевого канала, белок кальциевого канала или белок хлоридного канала. В конкретных вариантах осуществления способов представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок ионного канала, такой как, например, BKCa, MaxiK, Sk, NaV1, CACNG1, CAV, CIC или белок канала с транзиторным рецепторным потенциалом (TRP). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок NaV1 или его часть. В конкретных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок NaV1.7 или его часть. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок CACNG1 или его часть.

[0021] В определенных вариантах осуществления способов представляющий интерес трансмембранный белок, презентированный комплексом, связывается с антителом на клеточной поверхности антителопродуцирующей клетки. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом (связывающим доменом, присутствующим на представляющем интерес трансмембранном белке), расположенным на конкретном домене представляющего интерес трансмембранного белка, таким как, например, внеклеточный домен представляющего интерес трансмембранного белка. В конкретных вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом, расположенным на внеклеточной части N-концевого домена представляющего интерес трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом, расположенным на внеклеточной петле представляющего интерес трансмембранного белка или внеклеточной части C-концевого домена представляющего интерес трансмембранного белка. В определенных вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом, расположенным на C-концевом домене представляющего интерес трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом, расположенным на внеклеточной петле представляющего

интерес трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом, расположенным на внутриклеточном домене представляющего интерес трансмембранного белка.

[0022] Способы также могут включать приведение популяции антителопродуцирующих клеток в контакт с обнаруживаемым элементом, который связывается с представляющим интерес белком клеточной поверхности или биомаркером. Например, гетерогенную популяцию антителопродуцирующих клеток, полученных от иммунизированного животного, можно привести в контакт с антителом, меченным флуоресцентной меткой, которое связывается с белком поверхности В-клетки, таким как, например, IgG. Затем из субпопуляции можно получить субпопуляцию антителопродуцирующих клеток, представляющих собой В-клетки, посредством обнаружения связывания между антителом и В-клетками и выделения связанных клеток из популяции. В определенных вариантах осуществления популяцию антителопродуцирующих клеток можно привести в контакт с меченым флуоресцентной меткой антителом, которое связывается с белком поверхности В-клеток, в то же время клетки приводят в контакт с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащим представляющий интерес трансмембранный белок, или клетки можно привести в контакт в отличающиеся моменты времени.

[0023] В определенных вариантах осуществления способы также могут включать приведение популяции антителопродуцирующих клеток в контакт с блокирующим средством. Например, популяцию антителопродуцирующих клеток можно привести в контакт с молекулой, такой как пептид или соединение, которая распознает или связывается с частью представляющего интерес трансмембранного белка, частью белка MSP или обнаруживаемым маркером, таким как His-метка или FLAG-метка. В таких вариантах осуществления антителопродуцирующие клетки инкубируют с одним или более блокирующими средствами в целях обеспечения связывания между блокирующим(-и) средством(-ами) и антителом, продуцируемым антителопродуцирующими клетками, которые связывают эпитоп, расположенный на блокирующем средстве.

[0024] Способы также могут включать промывание популяции клеток, таких как антителопродуцирующие клетки, в течение определенного периода времени, который является достаточным для удаления несвязанных материалов или клеток от связанных клеток.

[0025] Связывание между антителом, созданным с помощью антителопродуцирующих клеток, и связывающими доменами (эпитопами), присутствующими на представляющем интерес трансмембранном белке, презентированном с помощью комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, можно обнаружить, и антителопродуцирующие клетки, связанные с трансмембранным белком, можно собрать. Например, в некоторых вариантах осуществления связывание обнаруживают по конформационному изменению представляющего интерес трансмембранного белка, активации или дезактивации представляющего интерес трансмембранного белка в клетке или с помощью одного или более обнаруживаемых маркеров. В определенных вариантах осуществления антителопродуцирующие клетки, презентующие антитела, связанные с представляющим интерес трансмембранным белковым антигеном, можно обнаруживать и выделять из других антителопродуцирующих клеток в популяции с применением высокопроизводительных методик выделения отдельных клеток, таких как сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS). В одном варианте осуществления FACS применяют для идентификации и выделения отдельных антителопродуцирующих клеток, которые связались с представляющим интерес трансмембранным белком, липидом, презентированным с помощью комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, путем обнаружения сигнала, испускаемого обнаруживаемой меткой, прикрепленной к комплексу или представляющему интерес трансмембранному белку, охватываемыми в данном документе. В конкретных вариантах осуществления сигнал испускается одной или более из следующих обнаруживаемых меток: комплекса биотин/стрептавидин-PE или флуоресцентной молекулы.

[0026] Способы также могут включать получение или выделение антител или нуклеиновых кислот, кодирующих антитела, из антителопродуцирующих клеток.

[0027] В определенных вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело (например, ген) или его часть, выделяют из антителопродуцирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует переменный домен антитела. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь антитела или ее фрагмент. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь антитела или ее фрагмент. В определенных случаях нуклеиновая кислота, выделенная из антителопродуцирующей клетки, кодирует полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение из антителопродуцирующей клетки нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела, экспрессируемого клеткой, и нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, экспрессируемого клеткой.

[0028] В определенных вариантах осуществления способов нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, экспрессируется в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту, культивируют в условиях, при которых экспрессируется полноразмерное антитело, после чего антитело можно продуцировать и выделить для дальнейшего применения. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует переменный домен антитела, и клетку культивируют в условиях, при которых экспрессируется переменный домен. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует переменный домен тяжелой цепи (V_H) антитела, и клетку культивируют в условиях, при которых экспрессируется V_H -домен. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует переменный домен легкой цепи (V_L) антитела, и клетку культивируют в условиях, при которых экспрессируется V_L -домен. В конкретных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует V_H -домен антитела, и нуклеиновую кислоту, которая кодирует V_L -домен антитела, и клетку культивируют в условиях, при которых экспрессируется V_H -домен и V_L -домен.

[0029] Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены клетки, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, специфическое в отношении представляющего интерес трансмембранного белка, выделенное с применением способов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления предусмотрена клетка, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует переменный домен тяжелой цепи (V_H) антитела, специфического в отношении представляющего интерес трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления предусмотрена клетка, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует переменный домен легкой цепи (V_L) антитела, специфического в отношении представляющего интерес трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления предусмотрена клетка, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует V_H -домен антитела, специфического в отношении представляющего интерес трансмембранного белка, и нуклеиновую кислоту, которая кодирует V_L -домен антитела. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эукариотическую клетку. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В одном варианте осуществления клетка может представлять собой любой один или более из следующих типов клеток: клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, VEGGIE-CHO), COS (например, COS-7), почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальной), CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0 и клетки MMT и опухолевой клетки. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO.

[0030] Такие и другие цели, признаки и преимущества раскрытых способов станут очевидными из последующего подробного описания различных аспектов способа, взятого вместе с прилагаемыми графическими материалами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ И ТАБЛИЦ

[0031] На фиг. 1A — 1B продемонстрировано, что представляющий интерес трансмембранный белок, презентированный с помощью комплекса липидный бислои-

мембранный каркасный белок, специфически связывает антитела, которые распознают представляющий интерес трансмембранный белок и являются обнаруживаемыми *in vitro* с применением раскрытых способов. Комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащие по меньшей мере два мембранных каркасных белка, каждый из которых содержит обнаруживаемую метку Bir-A и первый иллюстративный представляющий интерес трансмембранный белок (комплекс с GPCR1), сравнивали с контрольными комплексами липидный бислой-мембранный каркасный белок, которые не содержат представляющий интерес трансмембранный белок (пустой комплекс), по их способности связывать иллюстративное антитело, о котором известно, что оно связывает GPCR1 (положительный контроль АВ), и изотипическое контрольное mAb (отрицательный контроль АВ), которое не связывает белок GPCR. (А) На гистограмме показаны результаты октетного анализа, демонстрирующие, что представляющий интерес трансмембранный белок, презентированный с помощью комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, специфически связывается с антителом положительного контроля (0,6 нМ), но связь отсутствует между антителом к GPCR1 и пустым комплексом (-0,05 нМ), антителом отрицательного контроля и комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, включая трансмембранный белок GPCR1 (-0,06 нМ), или между антителом отрицательного контроля и пустым комплексом (-0,03 нМ). (В) Способность обнаруживать и отделять биотинилированные комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующие представляющий интерес трансмембранный белок (комплекс с GPCR1), от биотинилированных комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок, которые не содержат представляющий интерес трансмембранный белок (пустой комплекс), анализировали путем размещения биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок с трансмембранным белком или без него в планшеты, содержащие связанный с ним стрептавидин, а затем инкубирования с антителом, о котором известно, что оно связывает GPCR1 (положительный контроль АВ), или антителом отрицательного контроля. На гистограмме показано, что представляющий интерес трансмембранный белок, презентированный с помощью комплекса липидный бислой-мембранный каркасный

белок, специфически связывается с антителом положительного контроля, но не с антителом отрицательного контроля.

[0032] На фиг. 2A — 2F продемонстрировано обнаружение и отделение антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитела, специфические в отношении иллюстративных представляющих интерес трансмембранных белков, посредством проточной цитометрии. Спленоциты собирали и выделяли у контрольных мышей, которые не были иммунизированы (A, C, E), и у генетически сконструированных мышей, иммунизированных инъекцией ДНК, кодирующей первый представляющий интерес трансмембранный белок (GPCR1, B), второй представляющий интерес трансмембранный белок (GPCR2, D) или третий представляющий интерес трансмембранный белок (GPCR3, F). Популяцию В-клеток (клетки, положительные в отношении поверхностных IgG), которые экспрессируют антитела, специфические в отношении каждого из иллюстративных представляющих интерес трансмембранных белков (антигенсвязывающих клеток), обнаруживали и собирали с применением FACS посредством окрашивания спленоцитов флуоресцентными метками к маркерам В-клеток (т. е. антителами к IgG) и приведения популяции клеток в контакт с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который презентует один из иллюстративных представляющих интерес трансмембранных белков. (A) Лишь две В-клетки на один миллион спленоцитов, полученных от контрольной мыши, неспецифически связывались с первым представляющим интерес трансмембранным белком, презентированным с помощью презентирования биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок (прямоугольник). (B) Одиннадцать из одного миллиона В-клеток, экспрессирующих антитело, специфическое в отношении первого иллюстративного представляющего интерес трансмембранного белка GPCR (GPCR1), были обнаружены с применением настоящих способов (прямоугольник). (C) Лишь две В-клетки на один миллион спленоцитов, полученных от контрольной мыши, неспецифически связывались со вторым представляющим интерес трансмембранным белком, презентированным с помощью презентирования биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок (прямоугольник). (D) Семьдесят восемь из одного миллиона В-клеток, экспрессирующих антитело, специфическое в отношении

второго иллюстративного представляющего интерес трансмембранного белка GPCR (GPCR2), были обнаружены с применением настоящих способов (прямоугольник). (E) Лишь одиннадцать В-клеток, которые неспецифически связывались с третьим представляющим интерес трансмембранным белком, презентированным с помощью презентирования биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок (прямоугольник), были получены из одного миллиона спленоцитов от контрольной мыши. (F) Семьдесят пять из одного миллиона В-клеток, экспрессирующих антитело, специфическое в отношении третьего иллюстративного представляющего интерес трансмембранного белка GPCR (GPCR3), были обнаружены с применением настоящих способов (прямоугольник).

[0033] На фиг. 3 показано, что антитела, выделенные из антителопродуцирующих клеток с применением биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок для презентирования трансмембранного белкового антигена, специфически связываются со вторым иллюстративным представляющим интерес трансмембранным белком GPCR независимо от типа применяемого иммуногена. Антителопродуцирующие клетки получали от генетически сконструированных мышей, иммунизированных либо с помощью ДНК, кодирующей трансмембранный белок (ДНК), либо очищенным представляющим интерес трансмембранным белком (белком) с применением биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующего представляющий интерес трансмембранный белок, и в ходе скрининга были созданы антитела. Обеспечивали экспрессию в клетках антигена, являющегося представляющим интерес полноразмерным трансмембранным белком (сверхэкспрессировали ТМВ), и клетки, экспрессирующие антиген, сравнивали с контрольными клетками, которые не трансфицировали с помощью ДНК, кодирующей любой из ТМВ (родительские клетки). Затем клетки инкубировали с антителами для идентификации антител, которые специфически связываются с иллюстративным представляющим интерес трансмембранным белком. Антитела над пунктирной линией были способны связывать представляющий интерес трансмембранный белок. В отличие от этого, антитела под пунктирной линией были слабыми связующими молекулами или неспособными связывать представляющий интерес трансмембранный белок, как показано

при сравнении с антителами положительного (с помощью квадратов) и отрицательного (с помощью треугольников) контроля.

[0034] На фиг. 4 показаны антитела, выделенные из антителопродуцирующих клеток с применением раскрытых способов, которые были экспрессированы в ходе скрининга связывания с антигеном, являющимся представляющим интерес трансмембранным белком, экспрессируемым на поверхности клеток. Антителопродуцирующие клетки получали от иммунизированных генетически сконструированных мышей с применением биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующего усеченную на N-конце форму антигена, являющегося представляющим интерес трансмембранным белком, и в ходе скрининга были созданы антитела. Обеспечивали экспрессию в клетках усеченной формы антигена, являющегося представляющим интерес трансмембранным белком (сверхэкспрессировали усеченный ТМВ), или обеспечивали экспрессию в клетках полноразмерной формы антигена, являющегося представляющим интерес трансмембранным белком (сверхэкспрессировали полноразмерный ТМВ), и экспрессирующие антиген клетки сравнивали с контрольными клетками, которые не трансфицировали с помощью ДНК, кодирующей либо усеченный антиген ТМВ, либо полноразмерный ТМВ (родительские клетки), при инкубации клеток с антителами для идентификации антител, которые специфически связываются с эпитопом, расположенным во внеклеточном петлевом домене иллюстративного представляющего интерес трансмембранного белка (в рамке).

[0035] Таблица 1. Выделение антитела из клеток, которые экспрессируют антитела клеточной поверхности к различным трансмембранным белкам, от иммунизированных мышей. Мышей, которые были генетически модифицированы для предотвращения экспрессии представляющего интерес трансмембранного белка с эндогенного гена (генетически модифицированная мышь без антигена), или генетически модифицированных мышей, которые экспрессируют представляющий интерес трансмембранный белок с эндогенного гена (генетически модифицированная мышь), иммунизировали с помощью ДНК, кодирующей представляющий интерес

трансмембранный белок (ДНК), ДНК, кодирующей модифицированную форму трансмембранного белка (модифицированной ДНК), очищенного трансмембранного белка (белка), комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающего в себе представляющий интерес трансмембранный белок (комплекса с антигеном), или их комбинации. Антителопродуцирующие клетки собирали с применением способов сортировки, раскрытых в данном документе (сортировки клеток и комплекс с антигеном), и антитела выделяли из клеток и сравнивали с антителами, выделенными из клеток, полученных с применением стандартных гибридных методик (гибридомы). Для каждого из проанализированных трансмембранных белков из антителопродуцирующих клеток получали более высокий процент антител, которые связывали представляющий интерес трансмембранный белок, посредством сортировки клеток с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующим представляющий интерес трансмембранный белок, чем при использовании стандартных гибридных методик.

[0036] Таблица 2. Сравнение стратегий сортировки клеток по способности получать антителопродуцирующие клетки, которые экспрессируют антитело, которое специфически связывается с представляющим интерес трансмембранным белком. Генетически сконструированных мышей с (VI) эндогенным геном или без (VI-KO) эндогенного гена мыши, кодирующего иллюстративный представляющий интерес трансмембранный белок, т. е. GPCR1 или белок 2 ионного канала, иммунизировали путем введения инъекции одного или более из следующих иммуногенов: ДНК, кодирующей представляющий интерес трансмембранный белок (ДНК), очищенного трансмембранного белка (белка), вирусоподобной частицы, способной экспрессировать представляющий интерес трансмембранный белок (VLP), или их комбинации (VLP и ДНК). В-клетки, полученные от иммунизированных мышей, затем сортировали с применением одного из следующих сортирующих средств: биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, который презентует трансмембранный белок (комплекс с ТМВ), VLP или очищенный трансмембранный белок (белок). Затем собирали клетки, которые продуцировали антитела, которые связывались с сортирующим средством, и из каждой клетки получали антитела для сравнения.

[0037] Таблица 3. Сравнение антитела, полученного из антителопродуцирующих клеток, полученных от генетически сконструированных мышей, которые были иммунизированы либо с помощью ДНК, кодирующей представляющий интерес человеческий трансмембранный белок (ДНК), либо очищенного человеческого трансмембранного белка (белка), при этом клетки, полученные от каждой мыши, сортировали с применением биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, который презентировал представляющий интерес трансмембранный белок (комплекс с ТМВ). В данных представлен результат 5 репрезентативных кампаний иммунизации.

[0038] Таблица 4. Выделение антителопродуцирующих клеток и получение антител от генетически модифицированных мышей, которые не экспрессируют мышинный гомолог двух разных иллюстративных представляющих интерес трансмембранных белков (VI-KO), сравнение отличающихся стратегий иммунизации для демонстрации биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок можно применять для получения перекрестно-реагирующего антитела, которое связывается с мышинным гомологом представляющего интерес трансмембранного белка (ТМВ мыши) и человеческим гомологом представляющего интерес трансмембранного белка (ТМВ человека). В представленных данных представлена комбинация четырех репрезентативных кампаний иммунизации в случае ТМВ1 и четырех репрезентативных кампаний иммунизации в случае ТМВ2.

[0039] Таблица 5. Выделение антителопродуцирующих клеток и получение антител от генетически модифицированных мышей, которые не экспрессируют мышинный гомолог иллюстративного представляющего интерес трансмембранного белка (VI-KO), демонстрируют, что иммунизация генетически модифицированных мышей с помощью комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающего в себе человеческий белок ТМВ2 (человеческий ТМВ2), и сортировка антителопродуцирующих В-клеток с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентировавшим человеческий белок ТМВ2 (комплекс с человеческим ТМВ2), и/или комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентировавшим

мышинный белок TMB2 (комплекс с мышинным TMB2), позволяла идентифицировать антителопродуцирующие В-клетки, которые экспрессируют перекрестно-реагирующие антитела, способные связывать гомологи мышинового белка TMB2 и человеческого белка TMB2, а также антитело, специфическое в отношении человеческого белка TMB2. В приведенных данных представлена комбинация двух репрезентативных кампаний иммунизации.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0040] В данном документе раскрыты способы, которые предусматривают использование комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок для презентирования трансмембранных белковых антигенов антителам, продуцируемым клетками. Комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок включают представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, а также липиды и мембранные каркасные белки, обычно обнаруживаемые в мембранах встречающихся в природе клеток и таким образом презентующие трансмембранный белковый антиген антителу в его естественной конформации. Таким образом, комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок применяют в настоящих способах для идентификации и сбора конкретной субпопуляции антител (или клеток, которые экспрессируют антитело) в популяции, которые связываются с эпитопом на трансмембранном белке, который доступен в природе, таким как, например, внеклеточный домен.

[0041] Без ограничения какой-либо теорией, способы, раскрытые в данном документе, свидетельствуют о том, что иммунизация животных и выделение антителопродуцирующих клеток от иммунизированных животных с применением комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок, которые презентуют антиген, являющийся представляющим интерес трансмембранным белком, позволяют идентифицировать клетки, которые продуцируют антитело, специфическое в отношении эпитопа на трансмембранных белках с правильной конформацией.

[0042] Кроме того, антитела и нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, можно выделить непосредственно из антителопродуцирующих клеток посредством, например, методик выделения и сбора отдельных клеток, таких как FACS. Таким образом, в

настоящем изобретении также предусмотрен эффективный и действенный способ получения антител с аффинностью к трансмембранным белкам непосредственно из популяции антителопродуцирующих клеток. Настоящие способы позволяют избежать необходимости трудоемкого скрининга, идентификации и отбора эпитоп-специфических антител посредством сайт-направленного мутагенеза и других известных методик в целях установления установить, распознает ли конкретное антитело требуемую часть представляющего интерес трансмембранного белка.

[0043] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения антител или популяции клеток, которые экспрессируют антитело к представляющему интерес трансмембранному белку, который включает приведение в контакт популяции антителопродуцирующих клеток с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который презентует представляющий интерес трансмембранный белок или его часть. В одном варианте осуществления способ включает приведение в контакт популяции антителопродуцирующих клеток, полученных от животного, с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающим в себе представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, для обеспечения связывания между трансмембранным белком (т. е. антигеном) и антителом на поверхности клетки и сбор связанных антителопродуцирующих клеток в пределах популяции клеток.

[0044] В последующем описании будут соблюдаться определенные обозначения в отношении применения терминологии. В целом, термины, применяемые в данном документе, предназначены для толкования в соответствии со значением данных терминов, как они известны специалистам в данной области техники. В практической реализации настоящего изобретения применяют многие общепринятые методики молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые доступны в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методики более подробно описаны, например, в *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 4th edition, J.F. Sambrook and D.W. Russell, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012; *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Melvyn Little, ed. Cambridge University Press 2009; «*Oligonucleotide Synthesis*» (M. J. Gait, ed., 1984); «*Animal Cell Culture*» (R. I.

Freshney, ed., 1987); «Methods in Enzymology» (Academic Press, Inc.); «Current Protocols in Molecular Biology» (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, и периодических обновлениях); «PCR: The Polymerase Chain Reaction», (Mullis et al., ed., 1994); «A Practical Guide to Molecular Cloning» (Perbal Bernard V., 1988); «Phage Display: A Laboratory Manual» (Barbas et al., 2001). Содержание данных источников по ссылкам и других источников, содержащих стандартные протоколы, широко известные специалистам в данной области техники и на которые полагаются специалисты в данной области техники, включая инструкции производителей, настоящим включено посредством ссылки как часть настоящего изобретения.

Иммунизация для создания антителопродуцирующих клеток

[0045] Иммунизация животных может быть осуществлена любыми способами, известными из уровня техники. См., например, E. Harlow and D. Lane «Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor» (1988); Malik and Lillehoj, Antibody techniques: Academic Press, 1994, CA. Например, иммуноген можно вводить непосредственно животному, такому как млекопитающее, различными путями, включая без ограничения внутривенную или внутрибрюшинную инъекцию, с адьювантом или без него, при этом адьювант может способствовать стимуляции иммунного ответа. Адьюванты, известные из уровня техники, включают без ограничения полный и неполный адьювант Фрейнда, систему адьювантов MPL+TDM (Sigma) или RIBI (мурамилдипептиды). См. O'Hagan, Vaccine Adjuvant, by Human Press, (2000) NJ. Термин «иммуноген» относится к композиции, содержащей антиген (такой как, например, представляющий интерес трансмембранный белок или кодирующая его нуклеиновая кислота), к которому в результате иммунного ответа хозяина образуются антиген-специфические антитела. Термин «антиген» относится к молекуле или части молекулы, способной связываться связывающим средством, таким как антитело или его фрагмент. Антиген также можно применять для получения антител, способных связываться с эпитопом каждого антигена.

[0046] Иммуноген можно вводить животному-хозяину в виде белка, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или его фрагмент, пептидного фрагмента, слитого белка или носителя, который содержит представляющий

интерес ген, кодирующий иммуноген, или белковый иммуноген или его пептидный фрагмент. Процесс иммунизации может индуцировать иммунный ответ у хозяина и вызывать экспрессию антигена (такого как представляющий интерес трансмембранный белок) с применением механизма клеточной экспрессии хозяина *in vivo*.

[0047] В данной области техники известны различные методики иммунизации, и их можно применять при осуществлении настоящих способов. Например, животное может быть иммунизировано путем инъекции иммуногена, такого как нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере часть представляющего интерес трансмембранного белка, по меньшей мере часть представляющего интерес трансмембранного белка, носителя, который включает такую нуклеиновую кислоту, представляющий интерес трансмембранный белок или его часть.

[0048] В некоторых случаях животное иммунизировано нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес трансмембранный белок или его часть. В определенных вариантах осуществления животное иммунизировано нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес полноразмерный трансмембранный белок. В конкретных вариантах осуществления животное иммунизировано нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес полноразмерный человеческий трансмембранный белок. В других вариантах осуществления животное иммунизировано нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес полноразмерный отличный от человеческого трансмембранный белок. В конкретных вариантах осуществления животное иммунизировано нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес полноразмерный мышинный трансмембранный белок.

[0049] Термин «нуклеиновая кислота», или «последовательность нуклеиновой кислоты», или «нуклеотидная последовательность» относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи остова, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, которые обладают такими же свойствами связывания, что и эталонная нуклеиновая кислота, и

которые метаболизируются способом, сходным с эталонными нуклеотидами. Термин «нуклеиновая кислота, кодирующая» или «нуклеиновая кислота, которая кодирует» относится к последовательности ДНК или РНК, которая кодирует последовательность аминокислот, такую как пептид, белок, обнаруживаемый элемент или метка и/или регуляторный элемент. «Ген» относится к последовательности нуклеиновой кислоты ДНК, которая кодирует последовательность аминокислот, которая включает все или часть одного или более полипептидов, белков или ферментов, и может включать или не включать интроны, а также регуляторные последовательности ДНК, такие как промоторные или энхансерные последовательности, 5'-нетранслируемую область или 3'-нетранслируемую область, которые влияют, например, на условия, при которых экспрессируется ген или продукт гена.

[0050] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» применяются в данном документе для обозначения полимера из аминокислотных остатков, связанных пептидными связями. Данные термины предусматривают полимеры аминокислот, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственные химические миметики соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также полимеры встречающихся в природе аминокислот и полимеры не встречающихся в природе аминокислот. Термин «белок» относится к крупным полипептидам. Например, в настоящем изобретении белок может быть полноразмерным или эндогенным белком. Термин «пептид» как правило относится к коротким полипептидам, таким как, например, фрагмент или часть белка или полипептида. Применяемый в данном документе термин «фрагмент» или «часть» полипептида или белка относится к любой части полипептида, меньшей, чем полноразмерный полипептидный или белковый продукт экспрессии. Фрагменты или части могут быть «усеченными» или делеционными аналогами полноразмерного белка, где один или более аминокислотных остатков были удалены из полноразмерного белка. Например, в настоящем изобретении пептид может быть описан как «усеченный белок», «часть белка» или «фрагмент белка». В определенных случаях «часть» представляющего интерес трансмембранного белка предусматривает по меньшей мере всю трансмембранную часть представляющего интерес трансмембранного белка. «Усеченный белок» может представлять собой часть представляющего интерес

трансмембранного белка, которая не содержит аминоконцевую и/или карбоксиконцевую часть полноразмерного белка. Синтетические полипептиды, пептиды и белки могут быть синтезированы, например, с применением автоматического синтезатора полипептидов или рекомбинантными методиками, известными специалистам в данной области техники.

[0051] Термины «трансмембранный белок» и «представляющий интерес трансмембранный белок» применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения белка или его полипептидной части, которая присоединена к мембране клетки или органеллы и встроена в нее. Следовательно, трансмембранный белок представляет собой белок, который пересекает мембрану и, таким образом, имеет в своем составе по меньшей мере один пронизывающий мембрану домен. В некоторых случаях трансмембранный белок также содержит по меньшей мере один цитоплазматический домен и/или по меньшей мере один внеклеточный домен. Цитоплазматический(-ие) домен(-ы) может(могут) представлять собой одно или более из аминоконцевого домена, карбоксиконцевого домена и внутриклеточного петлевого домена. Внеклеточный(-ые) домен(-ы) может(могут) представлять собой одно или более из аминоконцевого домена, карбоксиконцевого домена и внеклеточного петлевого домена. В некоторых случаях внеклеточный домен представляющего интерес трансмембранного белка предусматривает N-концевой внеклеточный домен, C-концевой внеклеточный домен и/или внеклеточный петлевой домен между одним или более пронизывающими мембрану доменами представляющего интерес трансмембранного белка. Трансмембранный белок может быть встречающимся в природе белком, происходящие от любого организма, в том числе без ограничения прокариот, эукариот и вирусов. В определенных вариантах осуществления трансмембранный белок может быть белком человека, шимпанзе, макаки-резуса, кролика, лошади, овцы, крысы, мыши, собаки, курицы или козы. В некоторых случаях трансмембранный белок представляет собой белок млекопитающих, такой как трансмембранный белок человека, мыши, крысы или примата. В конкретных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой человеческий белок. В конкретных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой отличный от человеческого белок. В одном

варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой мышинный белок.

[0052] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок является модифицированным таким образом, как описано в данном документе. Иллюстративные представляющие интерес модифицированные трансмембранные белки могут предусматривать одно или более из следующих изменений их нативной аминокислотной последовательности: замен аминокислот, делеций аминокислот, вставок аминокислот. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок модифицирован с удалением, т. е. «усечением», части трансмембранного белка, такой как, например, N-концевой и/или C-концевой домен полноразмерного белка. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок содержит стабилизирующие мутации на N-конце, в одном или более внеклеточных петлевых доменах, одном или более трансмембранных доменах, одном или более внутриклеточных доменах, на C-конце или их комбинацию. В определенных вариантах осуществления трансмембранный белок представляет собой химерный трансмембранный белок. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес модифицированный трансмембранный белок содержит один или более обнаруживаемых элементов, таких как, например, His-метка, FLAG-метка, Avi-метка или Bir-A-метка. В конкретном варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок содержит His-метку и FLAG-метку.

[0053] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный белок представляет собой активируемый лигандом белок, при этом трансмембранный белок изменяет конформацию в присутствии или в отсутствие лиганда (т. е. находится в активном и неактивном состоянии). Например, активируемый лигандом трансмембранный белок может связывать лиганд на внутриклеточном или внеклеточном домене, при этом связывание индуцирует конформационное изменение в одном или более доменах трансмембранного белка, которое модулирует передачу сигнала в клетке. В некоторых случаях представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой транспортер растворенных веществ (SLC), рецептор, рецептор с киназной активностью,

рецептор фактора роста I класса, рецептор, связанный с G-белком (GPCR), белок ионного канала или белок тетраспанин. В определенных случаях представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок GPCR, белок тетраспанин или белок ионного канала. В одном варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок SLC.

[0054] В одном варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок GPCR. GPCR для применения в настоящих способах хорошо известны из уровня техники. См., например, Foord et al., *Pharmacol. Rev.* (2005) 57:279-288, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Таким образом, GPCR может представлять собой любой из аденозинового рецептора, β -адренергического рецептора, рецептора нейротензина, рецептора мускариновой кислоты, рецептора 5-гидрокситриптамина, адренорецептора, рецептора анафилатоксина, рецептора ангиотензина, рецептора апеллина, рецептора бомбезина, брадикининового рецептора, каннабиноидного рецептора, хемокинового рецептора, холецистокининового рецептора, дофаминового рецептора, эндотелинового рецептора, рецептора свободных жирных кислот, рецептора желчных кислот, рецептора галанина, рецептора мотилина, рецептора грелина, рецептора гликопротеинового гормона, рецептора GnRH, рецептора гистамина, рецептора KiSS1-производного пептида, рецептора лейкотриена и липоксина, рецептора лизофосфолипида, рецептора меланин-концентрирующего гормона, рецептора меланокортина, рецептора мелатонина, рецептора нейромедина U, нейропептидного рецептора, рецептора семейства N-формилпептидов, рецептора никотиновой кислоты, опиоидного рецептора, опсин-подобного рецептора, рецептора орексина, рецептора P2Y, рецептора пептида P518, рецептора фактора активации тромбоцитов, рецептора прокинетина, рецептора пролактин-высвобождающего пептида, рецептора простаноида, активируемого протеазами рецептора, рецептора релаксина, рецептора соматостатина, рецептора SPC/LPC, рецептора тахикинина, рецептора следовых количеств аминов, рецептора тиотропин-высвобождающего гормона, рецептора уротензина, рецептора вазопрессина/окситоцина, орфанного GPCR, рецептора кальцитонина, рецептора кортикотропин-высвобождающего фактора, рецептора глюкагона, рецептора парашитовидной железы, рецептора

VIP/PACAP, рецептора LNB7TM, рецептора GABA, рецептора метаботропного глутамата и чувствительного к кальцию рецептора.

[0055] В определенных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок GPCR, такой как, например, CCR5, ADORA2A, ADRB3, C3AR1, ADRA2A, GLP1R, CCR4, CCR8 и CXCR4. В конкретном варианте осуществления трансмембранный белок представляет собой белок GPCR, выбранный из следующих белков GPCR: CCR5, ADORA2A, ADRB3, C3AR1, ADRA2A, GLP1R, CCR4, CCR8 или CXCR4. В одном варианте осуществления трансмембранный белок представляет собой CCR5. В другом варианте осуществления трансмембранный белок представляет собой ADORA2A. В других вариантах осуществления трансмембранный белок представляет собой C3AR1. В еще одном варианте осуществления трансмембранный белок представляет собой ADRA2A. В других вариантах осуществления трансмембранный белок представляет собой GLP1R.

[0056] В некоторых случаях трансмембранный белок представляет собой тетраспанин. В определенных случаях представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой тетраспанин, такой как, например, TSPAN 1 — TSPAN19, TSPAN21, TSPAN23, TSPAN 31, TSPAN 32, TSPAN 33, UPK1B, PRPH2, CD151, CD53, CD37, CD82, CD81, CD9, CD63, TCD63, CLND6 и CLND9. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный белок представляет собой CD63. В другом варианте осуществления трансмембранный белок представляет собой CLDN6. В других вариантах осуществления трансмембранный белок представляет собой CLDN9.

[0057] В других вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок ионного канала. В одном варианте осуществления белок ионного канала представляет собой белок потенциалзависимого ионного канала. В конкретном варианте осуществления белок потенциалзависимого ионного канала представляет собой субъединицу гамма-1 потенциалзависимого кальциевого канала (CACNG1) или белок потенциалзависимого калиевого канала, такой как, например, KVS или KIRS. В других вариантах осуществления белок ионного канала представляет собой белок активируемого кальцием калиевого канала (например, BKCa,

MaxiK или Sk), белок потенциалзависимого натриевого канала, такой как, например, белок NaV1 (например, альфа-субъединица 9 потенциалзависимого канала (NaV1.7), альфа-субъединица 2 потенциалзависимого канала (NaV1.2)), белок кальциевого канала (например, CAV) или белок хлоридного канала (например, ClC). В некоторых вариантах осуществления белок ионного канала представляет собой рецепторный белок канала с транзиторным рецепторным потенциалом (TRP). В конкретных вариантах осуществления TRP представляет собой канонический трансмембранный белок (TRPC), ваниллоидный рецептор (TRPV), меластатин (TRPM), полицистин (TRPP), муколипин (TRPML) или ананкириновый трансмембранный белок 1 (TRPA1), такой как канонический TRP (TRPC), ваниллоидные рецепторы (TRPV), меластатин (TRPM), полицистины (TRPP), муколипины (TRPML), анкириновый трансмембранный белок 1 (TRPA1). В конкретном варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой BKCa, MaxiK, Sk, NAV 1.7, CACNG1, CAV, ClC или TRP.

[0058] В определенных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок потенциалзависимого натриевого канала. Семейство потенциалзависимых натриевых каналов состоит из девяти известных представителей с аминокислотной идентичностью >50% в трансмембранных сегментах и внеклеточных петлевых областях. Белки таких каналов называются NaV1.1 — NaV1.9 и в целом называются «белками NaV1», и названия генов, которые кодируют NaV1.1 — NaV1.9, обозначаются *Scn1a* — *Scn11a*. Каждый из белков NaV1 имеет четыре повторяющихся домена, каждый из которых содержит шесть пронизывающих мембрану сегментов. Четвертый сегмент высоко консервативен и играет роль сенсора потенциала канала. Чувствительность к потенциалу данного канала обусловлена положительно заряженными аминокислотами, расположенными в каждом третьем положении четвертого сегмента (Nicholls et al., (2012) «From Neuron to Brain», 5th ed. pg. 86, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). При стимуляции изменением трансмембранного потенциала такой сегмент перемещается к внеклеточной стороне клеточной мембраны, позволяя каналу стать проницаемым для ионов. Ионы протекают через поры, которые можно разделить на две области. Более внешняя (т. е. более внеклеточная) часть поры образована областью между пятым и

шестым трансмембранными сегментами (также известная как «P-петля») каждого из четырех доменов. Такая область является более узкой частью поры и отвечает за ее ионную селективность. Внутренняя часть (т. е. более цитоплазматическая) поры образована объединенными пятым и шестым трансмембранными сегментами четырех доменов. Более конкретно, белок NaV1.1 человека соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа P35498.2; белок NaV1.2 человека соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа Q99250.3; белок NaV1.3 человека соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа Q9NY46.2; белок NaV1.4 человека соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа P35499.4; белок NaV1.5 человека соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа Q14524.2; белок NaV1.6 человека соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа Q9UQD0.1; белок NaV1.7 человека соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа Q15858.3; белок NaV1.8 человека соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа Q9Y5Y9.2, и белок NaV1.9 человека соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа Q9UI33.2.

[0059] В одном таком варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок NaV1. В конкретных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой NAV1.7. NaV1.7 экспрессируется в ноцицептивных (болевых) нейронах спинномозгового ганглия, симпатических нейронах, шванновских клетках и нейроэндокринных клетках. NaV1.7 является важным компонентом возбудимости мембраны и важен для болевого ощущения. Мутации с приобретением функции в гене *SCN9A* человека связаны с болевыми синдромами, в то время как мутации с утратой функции связаны с глубокой нечувствительностью к боли. NaV1.7 является высококонсервативным у разных видов, как видно из результатов выравнивания иллюстративных гомологичных последовательностей белков NaV1.7 от следующих 14 видов животных. Белок NaV1.7 человека соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером

доступа Q15858.3; гомолог NaV1.7 шимпанзе соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_016804947.1; белок NaV1.7 макаки-резус соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_014965766.1; белок NaV1.7 малайского шерстокрыла соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_008588371.1; белок NaV1.7 крупного рогатого скота соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа NP_001104257.2; белок NaV1.7 овцы соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_004004679.1; белок NaV1.7 одногорбого верблюда соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_010980767.1; белок NaV1.7 косатки соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_004267302.1; белок NaV1.7 лошади соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_001496473.1; белок NaV1.7 собаки соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_022270547.1; белок NaV1.7 мыши соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа Q62205.2; белок NaV1.7 крысы соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа O08562.1; белок NaV1.7 кролика соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа Q28644.1, и белок NaV1.7 курицы соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа NP_001280211.1.

[0060] В конкретном варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой NaV1.7 человека. В другом варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой NaV1.7 мыши.

[0061] В других вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой NaV1.2. NaV1.2 экспрессируется в центральных нейронах и периферических нейронах. Мутации в гене *SCN2A* человека (кодирующем NaV1.2) были связаны с несколькими эпилептическими расстройствами и

расстройством аутистического спектра. NaV1.2 является высококонсервативным у разных видов, как видно из результатов выравнивания иллюстративных последовательностей белков NaV1.2 от 14 видов животных. Номера доступа для иллюстративных последовательностей, включенных в выравнивание, являются следующими: гомолог NaV1.2 человека соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа Q99250.3; гомолог NaV1.2 шимпанзе соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_003820970.1; белок NaV1.2 макаки-резус соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_001100368.1; белок NaV1.2 малайского шерстокрыла соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_008582720.1; белок NaV1.2 крупного рогатого скота соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа NP_001137581.1; белок NaV1.2 овцы соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_014948870.1; белок NaV1.2 одногорбого верблюда соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_010980763.1; белок NaV1.2 косатки соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_004283641.1; белок NaV1.2 лошади соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_014588001.1; белок NaV1.2 мыши соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа NP_001092768.1; белок NaV1.2 крысы соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа P04775.1; белок NaV1.2 кролика соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_008256915.1; белок NaV1.2 курицы соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа NP_001280210.1, и белок NaV1.2 зеленой морской черепахи соответствует аминокислотной последовательности, изложенной под номером доступа XP_007056690.1.

[0062] В конкретном варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой гомолог NaV1.2 человека. В другом варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой гомолог NaV1.2 мыши.

[0063] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок, представляет собой белок CACNG1. В одном варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок CACNG1 человека. В другом варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой отличный от человеческого белок CACNG1.

[0064] В определенных случаях представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой трансмембранный белок SLC. Белки SLC были охарактеризованы и хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, были идентифицированы сотни пронизывающих мембрану белков SLC человека, которые организованы в многочисленные семейства белков SLC, как описано, например, в Lin, L. et al. *Nat. Rev. Drug Disc.* (2015) 14:8 pp. 543-560, полное содержание которого явным образом включено в данный документ посредством ссылки. Соответственно, в определенных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок SLC, такой как, например, SLC01A2, SLC01B1, SLC01B3, SLC01B7, SLC01C1, SLC02A1, SLC02B1, SLC03A1, SLC04A1, SLC04C1, SLC05A1, SLC06A1, SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A4, SLC1A5, SLC1A6, SLC1A7, SLC2A1, SLC2A2, SLC2A3, SLC2A4, SLC2A5, SLC2A6, SLC2A7, SLC2A8, SLC2A9, SLC2A10, SLC2A11, SLC2A12, SLC2A13, SLC2A14, SLC3A1, SLC3A2, SLC4A1, SLC4A2, SLC4A3, SLC4A4, SLC4A5, SLC4A7, SLC4A8, SLC4A9, SLC4A10, SLC4A11, SLC5A1, SLC5A2, SLC5A3, SLC5A4, SLC5A5, SLC5A6, SLC5A7, SLC5A8, SLC5A9, SLC5A10, SLC5A11, SLC5A12, SLC6A1, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, SLC6A5, SLC6A6, SLC6A7, SLC6A8, SLC6A9, SLC6A10P, SLC6A11, SLC6A12, SLC6A13, SLC6A14, SLC6A15, SLC6A16, SLC6A17, SLC6A18, SLC6A19, SLC6A20, SLC6A21P, SLC7A1, SLC7A2, SLC7A3, SLC7A4, SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8, SLC7A9, SLC7A10, SLC7A11, SLC7A13, SLC7A14, SLC7A15P, SLC8A1, SLC8A2, SLC8A3, SLC8B1, SLC9A1, SLC9A2, SLC9A3, SLC9A4, SLC9A5, SLC9A6, SLC9A7, SLC9A8, SLC9A9, SLC9B1, SLC9B2, SLC9C1, SLC9C2, SLC10A1, SLC10A2, SLC10A3, SLC10A4, SLC10A5, SLC10A6, SLC10A7, SLC11A1, SLC11A2, SLC12A1, SLC12A2, SLC12A3, SLC12A4, SLC12A5, SLC12A6, SLC12A7, SLC12A8, SLC12A9, SLC13A1, SLC13A2, SLC13A3, SLC13A4, SLC13A5, SLC14A1, SLC14A2, SLC15A1, SLC15A2, SLC15A3, SLC15A4, SLC15A5,

SLC16A1, SLC16A2, SLC16A3, SLC16A4, SLC16A5, SLC16A6, SLC16A7, SLC16A8, SLC16A9, SLC16A10, SLC16A11, SLC16A12, SLC16A13, SLC16A14, SLC17A1, SLC17A2, SLC17A3, SLC17A4, SLC17A5, SLC17A6, SLC17A7, SLC17A8, SLC17A9, SLC18A1, SLC18A2, SLC18A3, SLC18B1, SLC19A1, SLC19A2, SLC19A3, SLC20A1, SLC20A2, SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC22A4, SLC22A5, SLC22A6, SLC22A7, SLC22A8, SLC22A9, SLC22A10, SLC22A11, SLC22A12, SLC22A13, SLC22A14, SLC22A15, SLC22A16, SLC22A17, SLC22A18, SLC22A20P, SLC22A23, SLC22A24, SLC22A25, SLC22A31, SLC23A1, SLC23A2, SLC23A3, SLC23A4P, SLC24A1, SLC24A2, SLC24A3, SLC24A4, SLC24A5, SLC25A1, SLC25A2, SLC25A3, SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, UCP1, UCP2, UCP3, SLC25A10, SLC25A11, SLC25A12, SLC25A13, SLC25A14, SLC25A15, SLC25A16, SLC25A17, SLC25A18, SLC25A19, SLC25A20, SLC25A21, SLC25A22, SLC25A23, SLC25A24, SLC25A25, SLC25A26, SLC25A27, SLC25A28, SLC25A29, SLC25A30, SLC25A31, SLC25A32, SLC25A33, SLC25A34, SLC25A35, SLC25A36, SLC25A37, SLC25A38, SLC25A39, SLC25A40, SLC25A41, SLC25A42, SLC25A43, SLC25A44, SLC25A45, SLC25A46, SLC25A47, SLC25A48, MTCH1, MTCH2, SLC25A51, SLC25A52, SLC25A53, SLC26A1, SLC26A2, SLC26A3, SLC26A4, SLC26A5, SLC26A6, SLC26A7, SLC26A8, SLC26A9, SLC26A10, SLC26A11, SLC27A1, SLC27A2, SLC27A3, SLC27A4, SLC27A5, SLC27A6, SLC28A1, SLC28A2, SLC28A3, SLC29A1, SLC29A2, SLC29A3, SLC29A4, SLC30A1, SLC30A2, SLC30A3, SLC30A4, SLC30A5, SLC30A6, SLC30A7, SLC30A8, SLC30A9, SLC30A10, SLC31A1, SLC31A2, SLC32A1, SLC33A1, SLC34A1, SLC34A2, SLC34A3, SLC35A1, SLC35A2, SLC35A3, SLC35A4, SLC35A5, SLC35B1, SLC35B2, SLC35B3, SLC35B4, SLC35C1, SLC35C2, SLC35D1, SLC35D2, SLC35D3, SLC35E1, SLC35E2A, SLC35E2B, SLC35E3, SLC35E4, SLC35F1, SLC35F2, SLC35F3, SLC35F4, SLC35F5, SLC35F6, SLC35G1, SLC35G2, SLC35G3, SLC35G4, SLC35G5, SLC35G6, SLC36A1, SLC36A2, SLC36A3, SLC36A4, SLC37A1, SLC37A2, SLC37A3, SLC37A4, SLC38A1, SLC38A2, SLC38A3, SLC38A4, SLC38A5, SLC38A6, SLC38A7, SLC38A8, SLC38A9, SLC38A10, SLC38A11, SLC39A1, SLC39A2, SLC39A3, SLC39A4, SLC39A5, SLC39A6, SLC39A7, SLC39A8, SLC39A9, SLC39A10, SLC39A11, SLC39A12, SLC39A13, SLC39A14, SLC40A1, SLC41A1, SLC41A2, SLC41A3, RHAG, RHBG, RHCG, SLC43A1, SLC43A2, SLC43A3, SLC44A1, SLC44A2, SLC44A3,

SLC44A4, SLC44A5, SLC45A1, SLC45A2, SLC45A3, SLC45A4, SLC46A1, SLC46A2, SLC46A3, SLC47A1, SLC47A2, SLC48A1, FLVCR1, FLVCR2, SLC49A3, SLC49A4, SLC50A1, SLC51A, SLC51B, SLC52A1, SLC52A2, SLC52A3, XPR1, MPC1, MPC2, MPC1L, LETM1, LETM2, LETMD1, SFXN1, SFXN2, SFXN3, SFXN4, SFXN5, NIPA1, NIPA2, NIPAL1, NIPAL2, NIPAL3, NIPAL4, MAGT1, TUSC3, MFSD2A, MFSD2B, MFSD4A, MFSD4B, MFSD5, ANKH, SPNS1, SPNS2, SPNS3, TMEM165, NPC1, NPC1L1, SLC66A1, SLC66A2, SLC66A3, CTNS и MPDU1.

[0065] Термин «эндогенный» относится к полипептиду, или полинуклеотиду, или другой композиции, которые естественным образом экспрессируются в организме-хозяине или возникают внутри клетки, ткани или организма. «Экзогенный» относится к полипептиду, полинуклеотиду или другой композиции, которые возникают вне клетки, ткани или организма или являются чужеродными для конкретного организма-хозяина.

[0066] В некоторых вариантах осуществления способов животное иммунизировано нуклеиновой кислотой, кодирующей часть представляющего интерес трансмембранного белка. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует усеченную версию полноразмерного представляющего интерес трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес усеченный трансмембранный белок не содержит один или более внеклеточных петлевых доменов, аминоконцевую и/или карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В конкретных вариантах осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит аминоконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В других вариантах осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит внеклеточный петлевой домен представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка.

[0067] В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировано нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, который заключен в носитель, способный экспрессировать нуклеиновую

кислоту. Неограничивающие примеры носителей для применения в иммунизации включают векторы, такие как плазмиды, векторы экспрессии, а также вирусоподобные частицы (VLP), клетки, такие как облученные клетки, экзосомы и липосомы. Термин «вектор» применяют для обозначения любой молекулы (например, нуклеиновой кислоты, плазмиды или вируса), применяемой для переноса кодирующей информации в клетку-хозяина. Примером вектора является «вектор экспрессии», который представляет собой конструкцию нуклеиновой кислоты, полученную рекомбинантным или синтетическим путем, с рядом конкретных элементов нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают транскрипцию конкретной нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Вектор экспрессии может представлять собой часть плазмиды, вируса или фрагмента нуклеиновой кислоты. В определенных случаях вектор экспрессии содержит транскрибируемую нуклеиновую кислоту, функционально связанную с промотором. Термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между последовательностью контроля экспрессии нуклеиновой кислоты (такой как, например, промотор или ряд сайтов связывания фактора транскрипции) и второй последовательностью нуклеиновой кислоты, где последовательность контроля экспрессии управляет транскрипцией нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

[0068] В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировано вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую представляющий интерес трансмембранный белок или его часть. В конкретных вариантах осуществления животное иммунизировано вектором экспрессии, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую представляющий интерес трансмембранный белок или его часть. В одном варианте осуществления животное иммунизировано плазмидой, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую представляющий интерес трансмембранный белок или его часть.

[0069] В некоторых случаях иммуноген вводят животному-хозяину посредством одной или нескольких инъекций с течением времени, например, посредством внутривенной инъекции или посредством внутрибрюшинной инъекции. В определенных вариантах осуществления иммуноген вводят млекопитающему-хозяину посредством 1, 2,

3, 4 или более инъекций. В конкретном варианте осуществления иммуноген вводят посредством 3 отдельных инъекций.

[0070] Количество иммуногена, вводимого животному, может быть легко определено специалистом в данной области техники с применением известных способов.

[0071] В некоторых случаях иммуноген, являющийся нуклеиновой кислотой, путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг/мл, по меньшей мере 1,0 мг/мл, по меньшей мере 1,5 мг/мл, по меньшей мере 2,0 мг/мл, по меньшей мере 3,0 мг/мл, по меньшей мере 4,0 мг/мл, по меньшей мере 5,0 мг/мл, по меньшей мере 6,0 мг/мл, по меньшей мере 7,0 мг/мл, по меньшей мере 8,0 мг/мл, по меньшей мере 9,0 мг/мл, по меньшей мере 9,5 мг/мл, по меньшей мере 10,0 мг/мл, по меньшей мере 10,5 мг/мл или больше. В определенных вариантах осуществления иммуноген, являющийся нуклеиновой кислотой, путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей от 0,5 мг/мл до 20 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 15 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 12 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 11 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 15 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 5 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 4 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 3 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 2 мг/мл, от 2,0 мг/мл до 12 мг/мл, от 5,0 мг/мл до 12 мг/мл, от 7,0 мг/мл до 12 мг/мл, от 8,0 мг/мл до 12 мг/мл, от 8,0 мг/мл до 11 мг/мл, от 9,0 мг/мл до 11 мг/мл или от 9,5 мг/мл до 10,5 мг/мл. В конкретных вариантах осуществления иммуноген, являющийся нуклеиновой кислотой, путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей 0,5 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,9 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,5 мг/мл, 1,6 мг/мл, 1,8 мг/мл, 2,0 мг/мл, 2,5 мг/мл, 3,0 мг/мл, 3,5 мг/мл, 4,0 мг/мл, 4,5 мг/мл, 5,0 мг/мл, 5,5 мг/мл, 6,0 мг/мл, 6,5 мг/мл, 7,0 мг/мл, 7,5 мг/мл, 8,0 мг/мл, 8,5 мг/мл, 9,0 мг/мл, 9,5 мг/мл, 10,0 мг/мл, 10,5 мг/мл, 11,0 мг/мл, 11,5 мг/мл, 12,0 мг/мл, 12,5 мг/мл, 13,0 мг/мл, 13,5 мг/мл, 14,0 мг/мл, 14,5 мг/мл, 15,0 мг/мл, 15,5 мг/мл или больше. В конкретном варианте осуществления иммуноген, являющийся нуклеиновой кислотой, путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей 1,6 мг/мл. В одном варианте осуществления иммуноген, являющийся нуклеиновой кислотой, путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей 10 мг/мл.

[0072] В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировано представляющим интерес трансмембранным белком или его частью. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок или его часть имеет человеческое происхождение. В других вариантах осуществления животное иммунизировано отличным от человеческого представляющим интерес трансмембранным белком. В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировано нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес полноразмерный мышинный трансмембранный белок. В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировано представляющим интерес полноразмерным трансмембранным белком. В конкретных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок является усеченным. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес усеченный трансмембранный белок не содержит один или более внеклеточных петлевых доменов, аминоконцевую и/или карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В конкретных вариантах осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит аминоконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В других вариантах осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В одном варианте осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит внеклеточный петлевой домен представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка.

[0073] В определенных случаях белковый или пептидный иммуноген вводят животному в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1 мг/мл, по меньшей мере 0,2 мг/мл, по меньшей мере 0,3 мг/мл, по меньшей мере 0,4 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг/мл, по меньшей мере 0,6 мг/мл, по меньшей мере 0,7 мг/мл, по меньшей мере 0,8 мг/мл, по меньшей мере 0,9 мг/мл, по меньшей мере 1,0 мг/мл, по меньшей мере 2,0 мг/мл, по меньшей мере 3,0 мг/мл, по меньшей мере 4,0 мг/мл, по меньшей мере 5,0 мг/мл, по меньшей мере 10,0 мг/мл или больше. В определенных вариантах осуществления белковый или пептидный иммуноген путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей от 0,1 мг/мл до 20 мг/мл, от 0,1 мг/мл до 15 мг/мл, от

0,1 мг/мл до 10 мг/мл, от 0,1 мг/мл до 8,0 мг/мл, от 0,1 мг/мл до 7,0 мг/мл, от 0,1 мг/мл до 6,0 мг/мл, от 0,1 мг/мл до 5,0 мг/мл, от 0,1 мг/мл до 3,0 мг/мл, от 0,1 мг/мл до 2,0 мг/мл, от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл, от 0,2 мг/мл до 10,0 мг/мл, от 0,2 мг/мл до 7,0 мг/мл, от 0,2 мг/мл до 6,0 мг/мл, от 0,2 мг/мл до 5,0 мг/мл, от 0,2 мг/мл до 3 мг/мл, от 0,2 мг/мл до 2 мг/мл, от 0,2 мг/мл до 1 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 10,0 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 7,0 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 5,0 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 3,0 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 2,0 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 1,0 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 5,0 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 3,0 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 2,0 мг/мл, от 2,0 мг/мл до 10,0 мг/мл, от 5,0 мг/мл до 10,0 мг/мл включительно. В конкретных вариантах осуществления белковый или пептидный иммуноген путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,35 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,45 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,55 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,65 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,75 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,85 мг/мл, 0,9 мг/мл, 0,95 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,5 мг/мл, 1,6 мг/мл, 1,8 мг/мл, 2,0 мг/мл, 2,5 мг/мл, 3,0 мг/мл, 3,5 мг/мл, 4,0 мг/мл, 4,5 мг/мл, 5,0 мг/мл, 5,5 мг/мл, 6,0 мг/мл, 6,5 мг/мл, 7,0 мг/мл, 7,5 мг/мл, 8,0 мг/мл, 8,5 мг/мл, 9,0 мг/мл, 9,5 мг/мл, 10,0 мг/мл, 12,0 мг/мл, 15,0 мг/мл, 20,0 мг/мл или больше. В конкретном варианте осуществления белковый или пептидный иммуноген путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей 0,9 мг/мл. В одном варианте осуществления белковый или пептидный иммуноген путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей 0,5 мг/мл. В другом варианте осуществления белковый или пептидный иммуноген путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей 1,9 мг/мл. В конкретном варианте осуществления белковый или пептидный иммуноген путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей 2,5 мг/мл.

[0074] В определенных вариантах осуществления животное иммунизировано нуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес химерный трансмембранный белок или представляющий химерный интерес трансмембранный белок. Применяемый в данном документе термин «химерный» относится к белку или нуклеиновой кислоте, которая кодирует белок, части которого происходят от отличающихся видов. Например, химерный белок может иметь один или более человеческих доменов и по меньшей мере один отличный от человеческого домен или наоборот. Нуклеиновая кислота, которая кодирует химерный белок, может иметь,

например, человеческий ген, кодирующий один или более доменов белка, функционально связанный с отличным от человеческого геном, кодирующим по меньшей мере один домен белка.

[0075] В одном неограничивающем примере химерная нуклеиновая кислота содержит часть человеческого гена, кодирующую первую часть трансмембранного белка, которая функционально связана с частью мышинового гена, кодирующей отличающуюся часть трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировано с помощью ДНК, кодирующей представляющий интерес химерный трансмембранный белок, который содержит последовательность человеческого гена, кодирующую один или более внеклеточных петлевых доменов человеческого трансмембранного белка, и последовательность мышинового гена, кодирующую аминоконцевой домен и/или карбоксиконцевой домен из мышинового гомолога трансмембранного белка. В других вариантах осуществления животное иммунизировано с помощью ДНК, кодирующей представляющий интерес химерный трансмембранный белок, которая предусматривает ДНК, кодирующую аминоконцевой домен и/или карбоксиконцевой домен из человеческого трансмембранного белка, и ДНК, кодирующую один или более внеклеточных петлевых доменов из мышинового гомолога трансмембранного белка. В одном варианте осуществления животное иммунизировано с помощью ДНК, кодирующей представляющий интерес химерный трансмембранный белок, которая содержит последовательность гена, кодирующую один или более внеклеточных петлевых доменов из человеческого трансмембранного белка, и последовательность, кодирующую аминоконцевой домен из мышинового гомолога трансмембранного белка. В конкретных вариантах осуществления животное иммунизировано с помощью ДНК, кодирующей представляющий интерес химерный трансмембранный белок, который содержит генную последовательность, кодирующую аминоконцевой домен из человеческого трансмембранного белка, и последовательность гена, кодирующую один или более внеклеточных петлевых доменов из мышинового гомолога трансмембранного белка. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес химерный трансмембранный белок, также модифицирована с включением нуклеотидной

последовательности, которая кодирует обнаруживаемый элемент, такой как, например, His-метка, FLAG-метка, Avi-метка или Bir-A-метка.

[0076] В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировано представляющим интерес химерным трансмембранным белком, который содержит часть человеческого представляющего интерес трансмембранного белка, функционально связанную с частью отличного от человеческого гомолога представляющего интерес трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировано представляющим интерес химерным трансмембранным белком, который содержит один или более внеклеточных петлевых доменов из человеческого представляющего интерес трансмембранного белка и аминоконцевой домен и/или карбоксиконцевой домен из мышинового гомолога трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировано представляющим интерес химерным трансмембранным белком, который содержит один или более внеклеточных петлевых доменов из человеческого трансмембранного белка и аминоконцевой домен из мышинового гомолога трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировано представляющим интерес химерным трансмембранным белком, который содержит аминоконцевой домен и/или карбоксиконцевой домен из человеческого трансмембранного белка и один или более внеклеточных петлевых доменов из мышинового гомолога трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировано представляющим интерес химерным трансмембранным белком, который содержит аминоконцевой домен из человеческого трансмембранного белка и один или более внеклеточных петлевых доменов из мышинового гомолога трансмембранного белка. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок также содержит обнаруживаемый элемент, такой как, например, His-метка, FLAG-метка, Avi-метка или Bir-A-метка. В одном варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит His-метку и FLAG-метку.

[0077] В определенных вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок или иммуноген, являющийся нуклеиновой кислотой,

модифицированы. В некоторых вариантах осуществления иммуноген является представляющим интерес модифицированным трансмембранным белком или кодирующей его ДНК, который содержит одну или более стабилизирующих аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления модифицированный трансмембранный белок или нуклеиновая кислота, кодирующая его, включают один или более обнаруживаемых элементов, таких как метка, маркер или часть. В одном варианте осуществления модифицированный иммуноген представляет собой представляющий интерес трансмембранный белок, содержащий обнаруживаемую метку. В конкретном варианте осуществления обнаруживаемая метка представляет собой FLAG-метку, Avi-метку, гистидиновую метку (His-метку), Bir-A-метку или их комбинацию. В конкретном варианте осуществления обнаруживаемая метка или обнаруживаемые метки расположены на аминоконце или карбоксиконце трансмембранного белкового иммуногена. В одном варианте осуществления трансмембранный белковый иммуноген содержит FLAG-метку и His-метку, прикрепленную к карбоксиконцу.

[0078] Белки для применения в способах могут быть получены способами, известными из уровня техники. Например, представляющий интерес трансмембранный белок или его часть могут кодироваться подходящей нуклеиновой кислотой и экспрессироваться в клетке. Подходящие молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие представляющий интерес трансмембранный белок, могут быть получены с применением стандартных методик клонирования, сайт-направленного мутагенеза и ПЦР, как хорошо известно из уровня техники. Подходящие системы экспрессии включают, например, конститутивные или индуцируемые системы экспрессии в бактериях или дрожжах, вирусные системы экспрессии, такие как бакуловирус, вирус леса Семлики и лентивирусы, или транзиентную трансфекцию в клетках насекомых или млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева включают клетки *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda* и *Trichoplusia ni*. Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают HEK 293, COS, CHO, NSO, DT40. Подходящие клетки-хозяева насекомых включают клетки Sf9 и S2.

[0079] В определенных вариантах осуществления белковый иммуноген, содержащий представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, экспрессируется в клетках, белковый иммуноген продуцируется клетками и его очищают с получением очищенного белкового иммуногена для иммунизации.

[0080] В конкретных вариантах осуществления животное может быть иммунизировано представляющим интерес трансмембранным белком или его частью, которые заключены в носителе, таком как, например, комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, VLP, клетка, экзосома и липосома.

[0081] «Комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок» означает композицию, которая содержит липидный бислой в комплексе с, т. е. связанном по меньшей мере с одним мембранным каркасным белком (MSP). Были описаны комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок. См., например, Inagaki, S. et al., *Biophysical Characterization of Membrane Proteins in Nanodiscs. Methods* (2013) 59(3):287-300, полное содержание которого явным образом включено в данный документ посредством ссылки. Комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок может быть образован, например, в виде дискоидального фосфолипидного бислоя, окруженного и стабилизированного двумя мембранными каркасными белками. Не ограничиваясь какой-либо одной теорией, образование и функция комплексов регулируются соотношением MSP к липидам и длиной MSP. Например, соотношение липидов к MSP можно корректировать для создания гомогенных или гетерогенных популяций комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок. Кроме того, в целях обеспечения среды, подобной нативной, белок MSP должен быть достаточно большим для того, чтобы образовывать комплекс, который обеспечивает пространство как для трансмембранного белка или представляющих интерес белков, так и для образования липидного бислоя.

[0082] Термин «мембранный каркасный белок» или «MSP», применяемый в данном документе, относится к классу амфипатических спиральных белков, происходящих от амфипатического аполипопротеина A-I (Apo-AI), как описано, например, в Schuler, M., et al., *Methods Mol Biol.* 2013; 974: 415–433, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Мембранные каркасные белки содержат амфипатические

спирали, содержащие гидрофобные остатки на внутренней стороне спиралей, которые контактируют с липидным гидрофобным хвостом, и гидрофильные остатки, которые ориентированы наружу (от липида). Мембранные каркасные белки могут иметь отличающиеся размеры за счет делеции или вставки одного или более спиральных доменов в части аминокислотной последовательности MSP, что делает возможным образование комплекса липидный бислой-MSP варьирующихся размеров. Подразумевается, что структура и функция MSP отличаются от сапозинового семейства связывающих липиды белков.

[0083] В некоторых случаях комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок содержат по меньшей мере один мембранный каркасный белок, выбранный из следующих иллюстративных MSP: MSP1, MSP2, MSP1E1, MSP1E2, MSP1E3, MSP1E3D1, MSP1D1, MSP1D2, MSP2N1, MSP2N3 и MSP2N2.

[0084] В некоторых вариантах осуществления мембранный каркасный белок представляет собой MSP1, содержащий структуру FX-N1-N2-N3-N4-N5-N6-N7-N8-N9-N10 [SEQ ID NO: 12], где FX представляет собой N-концевой домен мембранного каркасного белка, содержащий аминокислотную последовательность MGNHNNHIEGR [SEQ ID NO: 1], N1 представляет собой спираль 1, содержащую аминокислотную последовательность LKLLDNWDSVTSTFSKLREQLG [SEQ ID NO: 2], N2 представляет собой спираль 2, содержащую аминокислотную последовательность PVTQEFWDNLEKETEGLRQEMS [SEQ ID NO: 3], N3 представляет собой спираль 3, содержащую аминокислотную последовательность KDLEEVKAKVQ [SEQ ID NO: 4], N4 представляет собой спираль 4, содержащую аминокислотную последовательность PYLDDFQKKWQEEMELRQKVE [SEQ ID NO: 5], N5 представляет собой спираль 5, содержащую аминокислотную последовательность PLRAELQEGARQKLHELQEKLS [SEQ ID NO: 6], N6 представляет собой спираль 6, содержащую аминокислотную последовательность PLGEEMRDRARAHVDALRTHLA [SEQ ID NO: 7], N7 представляет собой спираль 7, содержащую аминокислотную последовательность PYSDELQRQLAARLEALKENGG [SEQ ID NO: 8], N8 представляет собой спираль 8, содержащую аминокислотную последовательность ARLAEYHAKATEHLSTLSEKAK

[SEQ ID NO: 9], H9 представляет собой спираль 9, содержащую аминокислотную последовательность PALEDLRQGLL [SEQ ID NO: 10], и H10 представляет собой спираль 10, содержащую аминокислотную последовательность PVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ [SEQ ID NO: 11]. В некоторых вариантах осуществления мембранный каркасный белок представляет собой MSP2, содержащий структуру FX-H1-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10-GT-H1-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [SEQ ID NO: 13]. В некоторых вариантах осуществления мембранный каркасный белок представляет собой удлиненный мембранный каркасный белок, который содержит одну или более амфипатических спиралей из 22 аминокислот, встроенных в аминокислотную последовательность MSP1. В одном таком варианте осуществления удлиненный мембранный каркасный белок представляет собой MSP1E1, содержащий структуру FX-H1-H2-H3-H4-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [SEQ ID NO: 14], где аминокислотная последовательность MSP1 удлинена за счет дублирования «H4». В другом варианте осуществления удлиненный мембранный каркасный белок представляет собой MSP1E2, содержащий структуру FX-H1-H2-H3-H4-H5-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [SEQ ID NO: 15], где аминокислотная последовательность MSP1 удлинена за счет дублирования «H4-H5». В еще одном варианте осуществления удлиненный мембранный каркасный белок представляет собой MSP1E3, содержащий структуру FX-H1-H2-H3-H4-H5-H6-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [SEQ ID NO: 16], где аминокислотная последовательность MSP1 удлинена за счет дублирования «H4-H5-H6».

[0085] В определенных вариантах осуществления мембранный каркасный белок представляет собой MSP1D1, содержащий структуру TEV-H1 Δ (1–11)-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [SEQ ID NO: 17], где TEV представляет собой модифицированный N-концевой домен, содержащий аминокислотную последовательность MGNHNNNNH DYDIPTTENLYFQG [SEQ ID NO: 18], и H1 Δ (1–11) представляет собой усеченный спиральный домен H1, содержащий аминокислотную последовательность STFSKLREQLG [SEQ ID NO: 19]. В некоторых вариантах осуществления мембранный каркасный белок представляет собой MSP1D2, содержащий структуру TEV-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [SEQ ID NO: 20]. В других вариантах осуществления мембранный каркасный белок представляет собой MSP2N1, характеризующийся структурой TEV-

H1Δ(1–11)-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10-GT-H1Δ(1–11)-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [SEQ ID NO: 21]. В другом варианте осуществления мембранный каркасный белок представляет собой MSP2N2, характеризующийся структурой TEV-H1Δ(1–11)-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10-GT-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [SEQ ID NO: 22]. В еще одном варианте осуществления мембранный каркасный белок представляет собой MSP2N3, характеризующийся структурой TEV-H1Δ(1–11)-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10-GT-H1Δ(1–17)-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [SEQ ID NO: 24], где H1Δ(1–17) представляет собой усеченный спиральный домен H1, содержащий аминокислотную последовательность REQLG [SEQ ID NO: 23].

[0086] В определенных вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок содержит два MSP. В одном варианте осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок представляет собой дискоидальный фосфолипидный бислой, окруженный двумя MSP (например, двумя молекулами MSP) в виде пояса. В другом варианте осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок представляет собой дискоидальный фосфолипидный бислой, окруженный двумя молекулами MSP1E3D1.

[0087] В некоторых вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок включает обнаруживаемую метку. В определенном варианте осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок содержит по меньшей мере два меченых мембранных каркасных белка и множество липидов. В конкретных вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок содержит два меченых мембранных каркасных белка и липидный бислой. В некоторых вариантах осуществления меченые мембранные каркасные белки являются одинаковыми или отличающимися. Обнаруживаемая метка может представлять собой любую обнаруживаемую метку, известную из уровня техники. Например, обнаруживаемая метка предусматривает флуоресцентную молекулу, His-метку и FLAG-метку. В иллюстративных вариантах осуществления один или более из мембранного(-ых) каркасного(-ых) белка(-ов) помечены с помощью обнаруживаемого маркера, такого как Bir-A-метка или Avi-метка, для биотинилирования. В конкретном

варианте осуществления все MSP в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок являются биотинилированными. Биотинилирование можно проводить, например, посредством химического биотинилирования мембранного(-ых) каркасного(-ых) белка(-ов) или посредством генетического введения Avi-метки или Bir-A-метки в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую MSP, и продуцирования модифицированного белка с применением известных методик.

[0088] Реконструируют часть комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок. Липиды могут образовывать бислой из липидов, таких как, например, сфинголипиды и/или фосфолипиды. Липидный состав комплекса может варьировать, например, на основании нативного типа клеток конкретного трансмембранного белка или представляющих интерес белков, подлежащих включению в комплекс. Например, мембрана *E. coli* содержит 70—80% фосфатидилэтаноламина, 15—20% фосфатидилглицерина и 5% кардиолипина, тогда как мембраны гепатоцитов крысы состоят из 14—20% фосфатидилэтаноламина, 32—47% фосфатидилхолина, 8% фосфатидилинозитола, 4—8% фосфатидилсерина и 13—14% сфингомиелина. См. Inagaki, S. et al., *Methods* (2013) 59(3):287-300. Таким образом, липидная композиция комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок может содержать один тип липидов или более одного типа липидов. В определенных вариантах осуществления липиды, которые образуют комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, являются синтетическими липидами или липидами, полученными рекомбинантным путем.

[0089] В некоторых вариантах осуществления липидный бислой состоит из одного или более из следующих липидов: сфингомиелина, фосфатидилхолина и их производных. В конкретном варианте осуществления липидный бислой состоит из 1-диолеоилфосфатидилхолина (DOPC), 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолина (POPC), 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилхолина (SOPC), фосфатидилэтаноламинов (PE) и фосфатидилсерина (PS), пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-*rac*-глицерина) (POPG), 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-L-серина (POPS) и фосфатидилинозитола (PI) или их комбинаций. В определенных вариантах осуществления липидный бислой содержит множество фосфолипидов POPC.

[0090] В некоторых вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок содержит липиды, которые образуют дискоидальный фосфолипидный бислой вокруг мембранного(-ых) каркаса(-ых) белка(-ов), содержащего(-их) множество из одного или более из следующих липидов: POPC, POPG и POPS. В конкретных вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок содержит множество липидов POPC, которые образуют дискоидальный фосфолипидный бислой вокруг двух мембранных каркасных белков. В одном таком варианте осуществления соотношение MSP к липиду составляет от 1:100 до 1:150, от 1:110 до 1:140, от 1:120 до 1:140, от 1:120 до 1:140, 1:120 — 1:130 и от 1:125 до 1:135 включительно. В других вариантах осуществления соотношение MSP к липиду составляет 1:100, 1:110, 1:111, 1:112, 1:113, 1:114, 1:115, 1:116, 1:117, 1:118, 1:119, 1:120, 1:121, 1:122, 1:123, 1:124, 1:125, 1:126, 1:127, 1:128, 1:129, 1:130, 1:131, 1:132, 1:133, 1:134, 1:135, 1:136, 1:137, 1:138, 1:139, 1:140, 1:141, 1:142, 1:143, 1:144, 1:145, 1:146, 1:147, 1:148, 1:149 или 1:150 включительно.

[0091] В определенных случаях комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок также содержит по меньшей мере один антиген. В конкретных вариантах осуществления антиген представляет собой представляющий интерес трансмембранный белок или его часть. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой представляющий интерес полноразмерный трансмембранный белок, представляющий интерес усеченный трансмембранный белок, представляющий интерес химерный трансмембранный белок. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес усеченный трансмембранный белок не содержит один или более внеклеточных петлевых доменов, аминоконцевую и/или карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В конкретных вариантах осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит аминоконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес усеченный трансмембранный белок содержит по меньшей мере всю трансмембранную часть представляющего интерес трансмембранного белка. В других вариантах осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит

карбоксихонцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В одном варианте осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит внеклеточный петлевой домен представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления усеченный белок содержит внеклеточный домен представляющего интерес трансмембранного белка, такой как N-концевой внеклеточный домен, C-концевой внеклеточный домен и/или внеклеточный петлевой домен между одним или более пронизывающими мембрану доменами представляющего интерес трансмембранного белка. В других вариантах осуществления антиген представляет собой представляющий интерес химерный трансмембранный белок или его часть, описанные в данном документе.

[0092] В некоторых вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, который содержит антиген, такой как представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, содержит одну молекулу антигена (например, одну копию трансмембранного белка или его часть на комплекс липидный бислой-MSP или на нанодиск). В некоторых вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, который содержит антиген, содержит несколько молекул антигена (например, несколько копий трансмембранного белка или его части на комплекс липидный бислой-MSP или на нанодиск).

[0093] Образование комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок, в том числе комплексов, которые заключают в себе представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, можно проводить с применением способов, известных из уровня техники. См., например, Waubert TH, et al., *Arch Biochem Biophys.* (2006) 450:215 — 222, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. В целом, образование комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок предусматривает самосборку комплексов путем смешивания липида, MSP и, если необходимо, трансмембранного белка. Как правило, трансмембранный белок очищают с применением одного или более детергентов. В некоторых вариантах осуществления очищенный трансмембранный белок смешивают с липидом и MSP с образованием комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащего

трансмембранный белок. В некоторых вариантах осуществления очищенный трансмембранный белок получают в присутствии одного или более детергентов (например, во фракции, солюбилизированной в детергенте) и смешивают с липидом и MSP и затем один или более детергентов удаляют с тем, чтобы индуцировать образование комплексной структуры.

[0094] В некоторых случаях можно применять стадию очистки для отделения комплексов, которые содержат представляющий интерес белок, от тех, которые не содержат его (т. е. пустых комплексов). Очистки можно достичь путем встраивания одной или нескольких обнаруживаемых меток в представляющий интерес трансмембранный белок, включенный в комплекс, таких как аффинная метка, и отбора по одной или более меткам. Иллюстративные обнаруживаемые метки для применения в качестве аффинных меток включают без ограничения His-метку, которая может быть распознана посредством аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом (IMAC), FLAG-метку для иммуноаффинной хроматографии с использованием антитела FLAG M1 к FLAG и 1D4-метку с применением смолы 1D4. Эксклюзионную хроматографию также можно использовать путем проведения, например, SDS-PAGE и анализа методом вестерн-блоттинга для идентификации и/или подтверждения присутствия комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок, который содержит представляющий интерес трансмембранный белок или его часть. В вариантах осуществления, где как представляющий интерес трансмембранный белок, так и MSP содержат обнаруживаемую метку, по меньшей мере одна метка на MSP и одна метка на представляющем интерес трансмембранном белке могут быть отличающимися.

[0095] В конкретных вариантах осуществления комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащий представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, может быть образован путем сначала солюбилизации представляющего интерес трансмембранного белка в детергенте (таком как, например, N-додецил- β -D-мальтозид (DDM)) и затем смешивания с солюбилизированным холатом фосфолипидом и мембранным каркасным белком с последующим удалением детергентов. В некоторых примерах детергент можно экстрагировать из смеси с применением

биогранул, что позволяет собирать дискоидальные комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, в которые встроен очищенный представляющий интерес трансмембранный белок. Дискоидальные комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, в которые встроен представляющий интерес трансмембранный белок, затем можно выделить из дискоидальных комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок, которые не содержат трансмембранный белок, с применением гранул для аффинной очистки. Например, гранулы с антителом к «метке» (например, FLAG-метке, His-метке, HA-метке и т. п., такие метки хорошо известны из уровня техники), когда представляющий интерес трансмембранный белок содержит соответствующую последовательность «метки» на его С-конце или N-конце. Дополнительной очистки можно достичь посредством эксклюзионной хроматографии.

[0096] В определенных случаях иммуноген, встроенный в комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, вводят животному в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1 мг/мл, по меньшей мере 0,2 мг/мл, по меньшей мере 0,3 мг/мл, по меньшей мере 0,4 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг/мл, по меньшей мере 0,6 мг/мл, по меньшей мере 0,7 мг/мл, по меньшей мере 0,8 мг/мл, по меньшей мере 0,9 мг/мл, по меньшей мере 1,0 мг/мл, по меньшей мере 2,0 мг/мл, по меньшей мере 3,0 мг/мл, по меньшей мере 4,0 мг/мл, по меньшей мере 5,0 мг/мл, по меньшей мере 10,0 мг/мл или больше. В определенных вариантах осуществления иммуноген путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей от 0,2 мг/мл до 20 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 15 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 10 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 7,0 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 5,0 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 10 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 5,0 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 4,0 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 3,0 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 2,0 мг/мл или от 2,0 мг/мл до 5,0 мг/мл включительно. В конкретных вариантах осуществления иммуноген путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей 0,5 мг/мл, 0,55 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,65 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,75 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,85 мг/мл, 0,9 мг/мл, 0,95 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,5 мг/мл, 1,6 мг/мл, 1,8 мг/мл, 2,0 мг/мл, 2,5 мг/мл, 3,0 мг/мл, 3,5 мг/мл, 4,0 мг/мл, 4,5 мг/мл, 5,0 мг/мл, 5,5 мг/мл, 6,0 мг/мл, 6,5 мг/мл, 7,0 мг/мл, 7,5 мг/мл, 8,0 мг/мл, 8,5 мг/мл, 9,0 мг/мл, 9,5 мг/мл, 10,0 мг/мл, 12,0 мг/мл, 15,0 мг/мл, 20,0 мг/мл или больше. В одном варианте осуществления иммуноген, являющийся представляющим интерес трансмембранным

белком, встроенным в комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, путем инъекции вводят животному в концентрации, составляющей 0,5 мг/мл.

[0097] В определенных вариантах осуществления животное может быть иммунизировано клетками, экспрессирующими иммуноген, такими как облученные клетки. В одном конкретном варианте осуществления животное может быть иммунизировано клетками, которые экспрессируют иммуноген, являющийся представляющим интерес трансмембранным белком, его модифицированную версию или его часть, описанные в данном документе.

[0098] В некоторых вариантах осуществления животное может быть иммунизировано с помощью VLP или экзосомы, которая экспрессирует представляющий интерес трансмембранный белок в организме животного. В конкретных вариантах осуществления животное может быть иммунизировано с помощью VLP, которая включает нуклеиновую кислоту, которая кодируют представляющий интерес трансмембранный белок, его модифицированную версию или его часть.

[0099] В некоторых случаях животное иммунизировано двумя или более иммуногенами, такими как, например, белок или пептид, модифицированный белок или пептид, нуклеиновая кислота, модифицированная нуклеиновая кислота, VLP и комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающий в себе представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, описанные в данном документе.

[0100] Подлежащее иммунизации животное может представлять собой любое животное. В определенных вариантах осуществления животное представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой мышь, крысу, козу, человека, хомяка, свинью, обезьяну или морскую свинку. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее не представляет собой человека. В конкретных вариантах осуществления отличное от человека млекопитающее представляет собой мышь, крысу или козу. В конкретном варианте осуществления млекопитающее представляет собой мышь. В другом варианте осуществления млекопитающее представляет собой человека, такого как, например, человек, который был подвергнут воздействию иммуногена.

[0101] В определенных случаях иммунизированное животное является генетически сконструированным. Генетическая модификация может быть проведена известными способами, такими как способы, применяемые для удаления или повреждения гена, который кодирует белок. Например, животное может быть генетически сконструировано таким образом, чтобы животное не экспрессировало представляющий интерес трансмембранный белок (т. е. антиген) с эндогенного локуса гена (например, нокаут). В качестве примера генетически сконструированным отличным от человека млекопитающим является мышь, которая является мышью, не способной экспрессировать представляющий интерес эндогенный трансмембранный белок мыши, например, в результате генетической модификации эндогенного локуса гена трансмембранного белка мыши или инактивации (например, делеции полностью или частично) эндогенного гена.

[0102] В определенных вариантах осуществления генетически сконструированное животное представляет собой отличное от человека млекопитающее, такое как, например, мышь, коза или крыса, которое содержит в своем геноме (например, посредством перекрестного скрещивания или стратегий целенаправленного воздействия на несколько генов): (i) локус тяжелой цепи гуманизованного иммуноглобулина, содержащий один или более человеческих

генных сегментов вариабельной области тяжелой цепи; (ii) локус тяжелой цепи гуманизированного иммуноглобулина, содержащий один или более человеческих генных сегментов вариабельной области легкой цепи, и/или (iii) локус легкой цепи гуманизированного иммуноглобулина (например, κ и/или λ), содержащий один или более человеческих генных сегментов вариабельной области легкой цепи. Применяемый в данном документе термин «гуманизированный» предусматривает модифицированный с включением человеческих последовательностей. Например, гуманизированный локус представляет собой локус (например, эндогенный локус), который был модифицирован с включением человеческих последовательностей (например, генных сегментов или генов).

[0103] В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированное животное представляет собой отличное от человека млекопитающее, такое как, например, мышь, коза или крыса, которое содержит в своем геноме локус тяжелой цепи гуманизированного иммуноглобулина, содержащий один или более человеческих генных сегментов вариабельной области тяжелой цепи.

[0104] В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированное животное представляет собой отличное от человека млекопитающее, такое как, например, мышь, коза или крыса, которое содержит в своем геноме локус легкой цепи гуманизированного иммуноглобулина, содержащий один или более человеческих генных сегментов вариабельной области легкой цепи.

[0105] В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированное животное представляет собой отличное от человека млекопитающее, такое как, например, мышь, коза или крыса, которое содержит в своем геноме локус легкой цепи гуманизированного иммуноглобулина (например, κ и/или λ), содержащий один или более человеческих генных сегментов вариабельной области легкой цепи. В одном варианте осуществления генетически

сконструированное животное содержит локус легкой цепи гуманизованного иммуноглобулина, содержащий один или более человеческих генных сегментов переменной области каппа-цепи (V_k) генные сегменты. В другом варианте осуществления генетически сконструированное животное содержит локус легкой цепи гуманизованного иммуноглобулина, содержащий один или более человеческих генных сегментов переменной области лямбда-цепи (V_λ) генные сегменты.

[0106] В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированное животное, которое содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи (V_H) человеческого иммуноглобулина, и/или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи (V_L) человеческого иммуноглобулина, также может не содержать эндогенный ген, кодирующий представляющий интерес трансмембранный белок.

[0107] В других случаях животное представляет собой животное «дикого типа», которое экспрессирует эндогенный гомолог представляющего интерес трансмембранного белка.

[0108] В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированное животное (например, крыса или мышь) продуцирует антитело, содержащее, среди прочего, тяжелые цепи, где каждая тяжелая цепь содержит человеческий переменный домен тяжелой цепи, функционально связанный с константным доменом тяжелой цепи грызуна (например, крысы или мыши). В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированное животное (например, крыса или мышь) продуцирует антитело, содержащее, среди прочего, где каждая цепь иммуноглобулина содержит человеческий переменный домен легкой цепи, функционально связанный с константным доменом тяжелой цепи грызуна (например, крысы или мыши). В некоторых вариантах осуществления генетически

сконструированное животное (например, крыса или мышь) продуцирует антитело, содержащее, среди прочего, легкие цепи κ , где каждая легкая цепь κ содержит человеческий переменный домен легкой цепи κ , функционально связанный с константным доменом легкой цепи κ грызуна (например, крысы или мыши). В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированное животное (например, крыса или мышь) продуцирует антитело, содержащее, среди прочего, легкие цепи λ , где каждая легкая цепь λ содержит человеческий переменный домен легкой цепи λ , функционально связанный с человеческим константным доменом легкой цепи λ . В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированное животное (например, крыса или мышь) продуцирует антитело, содержащее, среди прочего, легкие цепи, где каждая легкая цепь содержит человеческий переменный домен легкой цепи λ , функционально связанный с константным доменом легкой цепи λ грызуна (например, крысы или мыши). В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированное животное (например, крыса или мышь) продуцирует антитело, содержащее, среди прочего, легкие цепи λ , где каждая легкая цепь λ содержит человеческий переменный домен легкой цепи λ , функционально связанный с константным доменом легкой цепи λ грызуна (например, крысы или мыши).

[0109] В некоторых вариантах осуществления описываемое в данном документе отличное от человека животное (например, крыса или мышь) является таким, которое описано, например, в патентах США №№ 8502018, 8642835, 8697940, 8791323, 9226484 и WO 2019/113065; все из которых во всей своей полноте включены в данный документ посредством ссылки. Скрещивание (или «гибридизацию», или «перекрестное скрещивание») можно осуществлять согласно протоколам, легко доступным из уровня техники; см., например, базу данных JoVE Science Education Database. *Lab Animal Research, Fundamentals of Breeding and Weaning*, JoVE, Cambridge, MA, (2018) (видеостатья); *Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice, A Jackson Laboratory Resource Manual*,

©2007 The Jackson Laboratory; все включены в данный документ посредством ссылки. В качестве альтернативы, сконструированный локус легкой цепи Igλ можно получить путем конструирования в клетке ES, содержащей гуманизированный локус IgH и/или гуманизированный локус Igκ, и полученную в результате клетку ES применяют для получения генетически сконструированного животного, или генетически сконструированное животное, содержащее гуманизированный локус легкой цепи Igλ, можно скрестить с другим генетически сконструированным животным, содержащим гуманизированный локус IgH и/или гуманизированный локус Igκ. Известны различные генетически сконструированные животные, содержащие гуманизированный локус IgH и/или гуманизированный локус Igκ, например, линия VELOCIMMUNE® (см., например, патенты США №№ 8502018 и/или 8642835; включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), линия XENOMOUSE™ (см., например, Mendez, MJ et al., 1997, Nat. Genetics 15(2):146-56 и Jakobovits, A. et al., 1995, Ann. NY Acad. Sci. 764:525-35, включенные посредством ссылки во всей своей полноте).

[0110] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе генетически сконструированные животные содержат ограниченный локус легкой цепи иммуноглобулина, описанный в патентах США №№ 9796788; 9969814; публикациях заявок на патент США №№ 2011/0195454 A1, 2012/0021409 A1, 2012/0192300 A1, 2013/0045492 A1, 2013/0185821 A1, 2013/0302836 A1; публикациях международных заявок на патент №№ WO 2011/097603, WO 2012/148873, WO 2013/134263, WO 2013/184761, WO 2014/160179, WO 2014/160202, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе животные, представляющие собой грызунов, содержат локус легкой цепи иммуноглобулина, как описано в WO 2019/113065, WO 2017214089, US 20180125043 и патентах США №№ 9035128; 9066502; 9163092; 9150662; 9334333; 9006511; 9029628; 9206261; 9012717; 9394373; 9206262; 9206263; 9226484;

9540452 и 9399683, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0111] После иммунизации животного осуществляют мониторинг иммунного ответа животного на иммуноген с применением антиген-специфического иммуноанализа. Гуморальный иммунный ответ у животного можно определить на основании титров антител в сыворотке крови, специфических к представляющему интерес трансмембранному белку (антигену). Для определения титров антител можно использовать множество анализов, включая анализы на основе ELISA и проточной цитометрии (см., например, David H. Margulies, *Induction of Immune Responses, Current Protocols in Immunology*, 89, 1, (2.0.1-2.0.3) (2010); Henri V. van der Heyde et al., «Analysis of antigen-specific antibodies and their isotypes in experimental malaria», *Cytometry*, Vol. 71A (4): 242-250 (2007); оба включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления в анализе используются клетки, которые экспрессируют представляющий интерес трансмембранный белок на клеточной поверхности или сконструированы для его экспрессии, и титры антител можно определить путем измерения связывания антител с клетками.

[0112] При достижении соответствующего иммунного ответа у иммунизированного животного собирают популяцию клеток. Клетки могут быть собраны из ряда источников, включая без ограничения селезенку, лимфатический узел, костный мозг и периферическую кровь иммунизированного животного. В одном варианте осуществления клетки представляют собой популяцию клеток, полученных из селезенки иммунизированного животного, т. е. популяцию спленоцитов. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток представляет собой гетерогенную популяцию клеток, которая содержит клетки из отличающихся тканей, органов или участков иммунизированного животного. В конкретных вариантах осуществления популяция клеток представляет собой гомогенную популяцию клеток, которые получены из одного органа, такого как

селезенка иммунизированного животного. В одном варианте осуществления популяция клеток включает клетки тканевого происхождения из одного или более из селезенки, лимфатического узла и костного мозга. В других вариантах осуществления популяцию клеток получают из крови иммунизированных животных.

[0113] Клетки, собранные у иммунизированного животного, включают «антителопродуцирующие клетки», которые относятся к клеткам, которые экспрессируют антитело либо естественным образом (в результате активации В-клеток), либо в результате рекомбинантной технологии и генной инженерии (например, клетки гибридомы). Таким образом, термин «антителопродуцирующие клетки» охватывает иммунные клетки, такие как лимфоциты. В определенных неограничивающих примерах лимфоциты могут относиться к антиген-зависимой линии В-клеток, включая В-клетки памяти, плазмобласты и окончательно дифференцированные плазматические клетки, которые экспрессируют антитело, а также рекомбинантные клетки, такие как гибридомы и нелимфоидные клетки, сконструированные для экспрессии антител. Кроме того, «антителопродуцирующие клетки» охватывают клетки, в которых экспрессированное антитело связано с клеточной мембраной или заякорено в ней, т. е. антитела клеточной поверхности, а также клетки, которые секретируют антитело.

[0114] В определенных вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток происходит из селезенки, лимфатического узла, костного мозга или периферической крови иммунизированного животного. В конкретных вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток включает клетки периферической крови, В-клетки, плазматические клетки, плазматические клетки видов миеломы или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток включает рекомбинантные клетки, такие как, например, гибридомы. В конкретных вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток представляет собой

популяцию лимфоцитов, таких как, например, В-клетки. В одном варианте осуществления популяция антителопродуцирующих клеток состоит из В-клеток памяти.

[0115] Также в некоторых случаях дополнительные антителопродуцирующие клетки могут быть происходящими от исходной популяции антителопродуцирующих клеток, полученной посредством способов по настоящему изобретению. В связи с этим линии клеток, плазматические клетки, В-клетки памяти, гибридомы, плазматические клетки видов миеломы и рекомбинантные экспрессирующие антитела клетки могут быть происходящими от или полученными из антителопродуцирующих клеток. Например, антителопродуцирующие клетки могут быть слиты с клетками миеломы с образованием гибридом или иным образом иммортализованы, например, инфицированы вирусом (например, EBV), или могут быть дифференцированы с помощью методик сортировки клеток, основанных на белковых маркерах, экспрессируемых конкретными типами В-клеток.

[0116] В конкретных вариантах осуществления термин «антителопродуцирующие клетки» означает клетки, которые экспрессируют антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком, расположено на клеточной поверхности. В определенных случаях популяция антителопродуцирующих клеток представляет собой гетерогенную популяцию антителопродуцирующих клеток, которая содержит антителопродуцирующие клетки, которые экспрессируют антитело к более чем одному антигену. В одном конкретном варианте осуществления популяция антителопродуцирующих клеток представляет собой гетерогенную популяцию антителопродуцирующих клеток, которая содержит антителопродуцирующие клетки, которые экспрессируют антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком и по меньшей мере с одним другим антигеном. В других вариантах осуществления популяция

антителопродуцирующих клеток может представлять собой гомогенную популяцию антителопродуцирующих клеток, которая содержит антителопродуцирующие клетки, которые экспрессируют антитело, которое связывается только с одним антигеном. В конкретном варианте осуществления популяция антителопродуцирующих клеток представляет собой гомогенную популяцию антителопродуцирующих клеток, которая содержит антителопродуцирующие клетки, которые экспрессируют антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком.

[0117] Как показано в таблицах 1—5, иммунизация животных различными отличающимися иммуногенами и комбинациями иммуногенов приводила к образованию антителопродуцирующих клеток, включая популяции антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком. В таблицах 1—5 также показано, что иммунизация генетически модифицированных животных, которые не экспрессируют эндогенный ген, кодирующий представляющий интерес трансмембранный белок, приводит к образованию антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком.

Сбор антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело к представляющему интерес трансмембранному белку

[0118] Как описано в данном документе, препятствия для получения антител к трансмембранным белкам включают невозможность обеспечения достаточных количеств трансмембранных белковых антигенов с правильной конформацией для антител или клеток, которые продуцируют антитела к представляющему интерес трансмембранному белку. Например, очищенные эндогенные трансмембранные белки приобретают конформационные нарушения при выделении из их естественной мембранной среды, и современные препараты на основе липидов и на

основе клеточных мембран приводят к высоким уровням неспецифического связывания, их трудно составить и они зачастую дают субпопуляцию несвернутого или неправильно свернутого трансмембранного белкового антигена.

[0119] Настоящее изобретение позволяет преодолевать такие препятствия за счет использования комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок для презентирования трансмембранных белковых антигенов антителам, продуцируемым антителопродуцирующими клетками. Более конкретно, в настоящем изобретении используются комплексы, которые включают представляющий интерес трансмембранный белок, а также липиды и мембранные каркасные белки, обычно обнаруживаемые в мембранах встречающихся в природе клеток, для презентирования трансмембранного белка в его естественной конформации антителу. Таким образом, комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок применяют в настоящих способах для идентификации и сбора конкретной субпопуляции антител (или клеток, которые экспрессируют антитело) в популяции, которые связываются с эпитопом на трансмембранном белке, который доступен в природе.

[0120] После образования комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, включающего представляющий интерес трансмембранный белок, такой комплекс можно применять в качестве сортирующего средства для обнаружения и выделения популяции антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком. Например, гетерогенная популяция антителопродуцирующих клеток может быть получена от млекопитающего, иммунизированного таким образом, как описано в данном документе, и затем популяция антителопродуцирующих клеток может быть приведена в контакт с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который презентует антиген, который является представляющим интерес трансмембранным белком, антителу, продуцируемому клетками. Затем комплекс и

популяцию антителопродуцирующих клеток можно инкубировать для обеспечения связывания между представляющим интерес трансмембранным белком, презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым клетками. Затем можно обнаруживать связывание между антителом и представляющим интерес трансмембранным белком и связанные клетки можно собирать для дальнейшего применения.

[0121] В некоторых случаях популяция антителопродуцирующих клеток, полученная от иммунизированного животного, может представлять собой гетерогенную популяцию антителопродуцирующих клеток, которая содержит антителопродуцирующие клетки, которые экспрессируют антитело к более чем одному антигену. В конкретных вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток представляет собой гетерогенную популяцию антителопродуцирующих клеток, которая содержит определенные антителопродуцирующие клетки, которые экспрессируют антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком, и определенные антителопродуцирующие клетки, которые экспрессируют антитело, которое связывается с по меньшей мере одним другим антигеном. В определенных вариантах осуществления гетерогенная популяция антителопродуцирующих клеток состоит из по меньшей мере 0,01%, по меньшей мере 0,1%, по меньшей мере 0,5%, по меньшей мере 1,0%, по меньшей мере 1,5%, по меньшей мере 2,0%, по меньшей мере 3,0%, по меньшей мере 4,0%, по меньшей мере 5,0%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или больше антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком.

[0122] В других вариантах осуществления популяция антителопродуцирующих клеток может представлять собой гомогенную популяцию

антителопродуцирующих клеток, которая содержит антителопродуцирующие клетки, которые экспрессируют антитело, которое связывается только с одним антигеном. В конкретном варианте осуществления популяция антителопродуцирующих клеток представляет собой гомогенную популяцию антителопродуцирующих клеток, которая содержит антителопродуцирующие клетки, которые экспрессируют антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком. В определенных вариантах осуществления гомогенная популяция антителопродуцирующих клеток состоит из по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или больше антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком.

[0123] В определенных вариантах осуществления В-клетки могут быть обнаружены и собраны из гетерогенной популяции клеток, полученных от иммунизированного животного, одновременно с получением антителопродуцирующих клеток с получением популяции антителопродуцирующих В-клеток. В некоторых вариантах осуществления В-клетки могут быть получены из гетерогенной популяции клеток, полученных от иммунизированного животного, до получения антителопродуцирующих клеток из гетерогенной популяции клеток. В еще одном варианте осуществления В-клетки могут быть обнаружены в популяции антителопродуцирующих клеток, полученных от иммунизированного животного, с получением популяции антителопродуцирующих В-клеток.

[0124] В одном конкретном варианте осуществления антителопродуцирующие В-клетки, экспрессирующие антитела к представляющему интерес трансмембранному белку, могут быть обнаружены в гетерогенной

популяции клеток, полученных от иммунизированных животных и выделенных посредством FACS на основе маркеров клеточной поверхности В-клеток.

[0125] Маркеры В-клеток известны из уровня техники. Например, применимые маркеры В-клеток, которые можно обнаруживать с применением FACS, включают без ограничения IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, CD1, CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27, CD30, CD38, CD40, CD78, CD80, CD138, CD319, TLR4, IL-6, PDL-2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, IL-10 и TGF β . В конкретном варианте осуществления В-клетки могут быть обнаружены с применением меток, специфических в отношении IgG, IgM или их комбинации. В одном варианте осуществления антителопродуцирующие В-клетки обнаруживают с применением антител, специфических в отношении IgG.

[0126] В конкретном варианте осуществления после иммунизации спленоциты собирают у иммунизированного животного. После удаления эритроцитов популяцию IgG⁺-антиген-положительных В-клеток от иммунизированных животных выделяют из гетерогенной популяции клеток с применением описанных в данном документе способов. Например, спленоциты приводят в контакт с антителом к IgG и промывают с удалением избыточных несвязанных клеток и антитела. Затем клетки окрашивают с помощью флуоресцентного антитела (т. е. вторичного антитела), которое связывается с меченым маркером В-клеток (таким как антитело к IgG). Затем окрашенные клетки можно проанализировать посредством проточной цитометрии и выделить для дальнейшего применения, как изложено в данном документе.

[0127] В некоторых вариантах осуществления способов мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) собирают у млекопитающих, о которых известно, что они обладают гуморальным иммунитетом к представляющему интерес антигену. IgG⁺, антиген-положительные В-клетки, экспрессирующие антитела,

которые распознают представляющие интерес антиген, затем можно выделить для дальнейшей обработки в соответствии со способами по настоящему изобретению.

[0128] В некоторых вариантах осуществления способов популяция антителопродуцирующих клеток включает антителопродуцирующие В-клетки. В одном таком варианте осуществления популяция антителопродуцирующих В-клеток включает антителопродуцирующие В-клетки, которые экспрессируют антитела к представляющему интерес трансмембранному белку, которые могут быть обнаружены в гетерогенной популяции клеток, полученных от иммунизированных животных и выделенных путем приведения гетерогенной популяции клеток в контакт с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентирующим представляющий интерес трансмембранный белок, и молекулой, которая связывается с маркером В-клеток, такой как, например, антитело, которое связывается с маркером поверхности В-клеток. Например, после иммунизации у иммунизированного животного собирают спленоциты. После удаления эритроцитов гетерогенную популяцию клеток инкубируют с меченым антителом к IgG в целях обеспечения возможности связывания антитела к IgG с IgG⁺-положительными В-клетками в гетерогенной популяции клеток. В то же время, после или до инкубации с меченым антителом к IgG гетерогенную популяцию клеток инкубируют с меченым комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентирующим представляющий интерес трансмембранный белок, в целях обеспечения связывания трансмембранного белка с антителом, продуцируемым клетками. Затем можно получить популяцию антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело к представляющему интерес трансмембранному белку, например, посредством проточной цитометрии для обнаружения и выделения (сбора) клеток, связанных как с меченым антителом к IgG (В-клетки), так и с меченым комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок.

[0129] В некоторых случаях способы включают иммунизацию животного таким образом, как описано в данном документе.

[0130] В случаях, которые предусматривают приведение в контакт или инкубирование популяции клеток, такой как, например, популяция антителопродуцирующих клеток, с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок вносят в клеточную среду в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1 мг/мл, по меньшей мере 0,2 мг/мл, по меньшей мере 0,3 мг/мл, по меньшей мере 0,4 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг/мл, по меньшей мере 0,6 мг/мл, по меньшей мере 0,7 мг/мл, по меньшей мере 0,8 мг/мл, по меньшей мере 0,9 мг/мл, по меньшей мере 1,0 мг/мл, по меньшей мере 2,0 мг/мл, по меньшей мере 3,0 мг/мл, по меньшей мере 4,0 мг/мл, по меньшей мере 5,0 мг/мл, по меньшей мере 10,0 мг/мл или больше. В определенных вариантах осуществления комплекс добавляют к клеткам в концентрации, составляющей от 0,2 мг/мл до 20,0 мг/мл, от 0,2 мг/мл до 15,0 мг/мл, от 0,2 мг/мл до 10 мг/мл, от 0,2 мг/мл до 7,0 мг/мл, от 0,2 мг/мл до 5,0 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 10,0 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 7,0 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 5,0 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 10,0 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 7,0 мг/мл или от 1,0 мг/мл до 5,0 мг/мл включительно. В конкретных вариантах осуществления комплекс добавляют к клеткам в концентрации, составляющей 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,55 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,65 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,75 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,85 мг/мл, 0,9 мг/мл, 0,95 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,5 мг/мл, 1,6 мг/мл, 1,8 мг/мл, 2,0 мг/мл, 2,5 мг/мл, 3,0 мг/мл, 3,5 мг/мл, 4,0 мг/мл, 4,5 мг/мл, 5,0 мг/мл, 5,5 мг/мл, 6,0 мг/мл, 6,5 мг/мл, 7,0 мг/мл, 7,5 мг/мл, 8,0 мг/мл, 8,5 мг/мл, 9,0 мг/мл, 9,5 мг/мл, 10,0 мг/мл, 12,0 мг/мл, 15,0 мг/мл, 20,0 мг/мл или больше.

[0131] В одном аспекте способов иммунизированное животное представляет собой отличное от человека животное или генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, которое иммунизировано представляющим интерес человеческим трансмембранным белком или его частью, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей их, или их комбинацией.

[0132] В определенных вариантах осуществления способов отличное от человека животное или генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют представляющим интерес полноразмерным человеческим трансмембранным белком, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или их комбинацией, и выделяют спленоциты из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши), и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе полноразмерный человеческий трансмембранный белок, для обеспечения связывания между человеческим представляющим интерес трансмембранным белком (антигеном), презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым клетками. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (например, ViG-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на представляющем интерес полноразмерном человеческом трансмембранном белке.

[0133] В некоторых вариантах осуществления способов отличное от человека животное или генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют представляющим интерес полноразмерным человеческим трансмембранным белком, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или их комбинацией, и выделяют спленоциты из иммунизированного отличного от человека животного (например,

крысы или мыши), и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе часть человеческого трансмембранного белка, такого как усеченный человеческий трансмембранный белок, для обеспечения связывания между эпитопом на части представляющего интерес человеческого трансмембранного белка (антигене), презентруемого комплексом, и антителом, продуцируемым клетками. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (например, Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на антигене, презентруемым комплексом.

[0134] В вариантах осуществления способов, которые предусматривают комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащий часть представляющего интерес трансмембранного белка, трансмембранный белок, презентруемый комплексом, не включает представляющий интерес полноразмерный трансмембранный белок. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой усеченный трансмембранный белок, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес усеченный трансмембранный белок содержит по меньшей мере всю трансмембранную часть представляющего интерес трансмембранного белка. В определенных вариантах осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит один или более внеклеточных

петлевых доменов, аминоконцевую и/или карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления усеченный белок содержит внеклеточный домен представляющего интерес трансмембранного белка, такой как N-концевой внеклеточный домен, C-концевой внеклеточный домен и/или внеклеточный петлевой домен между одним или более пронизывающими мембрану доменами представляющего интерес трансмембранного белка. В конкретном варианте осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит аминоконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В другом варианте осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит внеклеточный петлевой домен представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка.

[0135] В других вариантах осуществления способов отличное от человека животное или генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют представляющим интерес полноразмерным человеческим трансмембранным белком, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или их комбинацией. Спленциты выделяют из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши) и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе химерный трансмембранный белок, который содержит часть человеческого представляющего интерес трансмембранного белка и часть отличного от человеческого гомолога представляющего интерес трансмембранного белка для того, чтобы обеспечить связывание между человеческой частью представляющего

интерес химерного трансмембранного белка (антигена), презентруемого комплексом, и антителом, продуцируемым клетками. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на человеческой части представляющего интерес химерного трансмембранного белка.

[0136] В вариантах осуществления способов, которые включают применение представляющего интерес химерного трансмембранного белка, химерный белок может содержать части представляющего интерес трансмембранного белка от двух отличающихся видов, как описано в данном документе. Например, химерный трансмембранный белок может содержать одну или более частей человеческого трансмембранного белка, функционально связанных с одной или более частями отличного от человеческого гомолога представляющего интерес трансмембранного белка. В некоторых случаях химерный трансмембранный белок содержит внеклеточный домен представляющего интерес трансмембранного белка, такой как N-концевой внеклеточный домен, C-концевой внеклеточный домен и/или внеклеточный петлевой домен между одним или более пронизывающими мембрану доменами представляющего интерес трансмембранного белка. Отличным от человеческого гомологом может быть гомолог любого отличного от человека животного, такого как, например, мышь, крыса, коза, хомяк, свинья, шимпанзе, лошадь, овца, обезьяна и морская свинка. В конкретном варианте осуществления отличное от человека млекопитающее представляет собой мышь, крысу или козу. В конкретном варианте осуществления отличное от человека млекопитающее представляет собой мышь.

[0137] В иллюстративных вариантах осуществления настоящих способов представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит один или

более внеклеточных петлевых доменов из представляющего интерес человеческого трансмембранного белка и аминоконцевой домен и/или карбоксиконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В одном варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит один или более внеклеточных петлевых доменов и карбоксиконцевой домен из человеческого трансмембранного белка и аминоконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В другом варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит один или более внеклеточных петлевых доменов, и аминоконцевой домен из человеческого трансмембранного белка, и карбоксиконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В другом варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит аминоконцевой домен и карбоксиконцевой домен из человеческого трансмембранного белка и один или более внеклеточных петлевых доменов из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В одном варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит аминоконцевой домен из человеческого трансмембранного белка и один или более внеклеточных петлевых доменов и карбоксиконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В еще одном варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит один или более внеклеточных петлевых доменов из отличного от человеческого гомолога и аминоконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка.

[0138] В других вариантах осуществления способов отличное от человека животное или генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют представляющим интерес полноразмерным человеческим трансмембранным белком, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или их комбинацией. Спленоциты

выделяют из иммунизированного отличного от человека животного и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который заключает в себе отличный от человеческого гомолог трансмембранного белка, для обеспечения связывания между представляющим интерес отличным от человеческого трансмембранным белком (антигеном), презентруемым комплексом, и перекрестно-реагирующим антителом, продуцируемым клетками. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют перекрестно-реагирующее антитело, которое связывает эпитоп, присутствующий на представляющем интерес отличным от человеческого трансмембранном белке и представляющем интерес человеческом трансмембранном белке.

[0139] В вариантах осуществления настоящих способов, которые включают применение отличного от человеческого гомолога представляющего интерес трансмембранного белка или его части, отличный от человеческого гомолог может представлять собой гомолог любого отличного от человека организма. Определенные примеры отличных от человека организмов включают без ограничения отличные от человека млекопитающие, рептилии, рыбы, бактерии, насекомые и вирусы. В некоторых вариантах осуществления отличный от человеческого белок может происходить от мыши, крысы, козы, хомяка, свиньи, шимпанзе, лошади, овцы, обезьяны и морской свинки. В конкретных вариантах осуществления отличный от человеческого гомолог белка происходит от мыши, крысы или козы. В конкретном варианте осуществления отличный от человеческого

гомолог представляет собой мышинный гомолог представляющего интерес трансмембранного белка.

[0140] В некоторых вариантах осуществления способов отличное от человека животное или генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют представляющим интерес полноразмерным человеческим трансмембранным белком, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или их комбинацией, спленоциты выделяют из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши) и инкубируют часть представляющего интерес полноразмерного человеческого трансмембранного белка (блокирующее средство на основе пептида) для обеспечения связывания между блокирующим средством на основе пептида и продуцируемым клетками антителом, которое специфически связывается с эпитопом, расположенным на блокирующем средстве. Клетки также инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, с меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток и с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе полноразмерный трансмембранный белок, для обеспечения связывания между представляющим интерес полноразмерным трансмембранным белком (антигеном), презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым оставшимися несвязанными клетками в популяции. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки можно промывать с исключением из результатов сортировки всех клеток, связанных с блокирующим средством на основе пептида, несвязанного и избыточного PE-стрептавидина и меченых антител к маркеру В-клеток. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции

антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на представляющем интерес полноразмерном человеческом трансмембранном белке, который не присутствует на части, соответствующей блокирующему средству на основе пептида.

[0141] В вариантах осуществления способов, которые включают применение блокирующего средства, блокирующее средство может представлять собой любую молекулу, такую как, например, пептид, полипептид, химическое соединение. В таких вариантах осуществления блокирующее средство может представлять собой полипептид или пептид, который соответствует части представляющего интерес трансмембранного белка, полипептид или полипептид, который соответствует части белка MSP, или обнаруживаемый маркер, такой как His-метка или FLAG-метка. В некоторых вариантах осуществления блокирующее средство предусматривает обнаруживаемую метку. В других вариантах осуществления блокирующее средство не предусматривает обнаруживаемую метку. В одном варианте осуществления блокирующее средство представляет собой пептидную или полипептидную часть представляющего интерес трансмембранного белка, которую можно инкубировать с популяцией антителопродуцирующих клеток для обеспечения связывания между блокирующим средством и антителом, продуцируемым антителопродуцирующими клетками, которое специфически связывает эпитоп, расположенный на блокирующем средстве. В одном варианте осуществления блокирующее средство представляет собой представляющий интерес усеченный трансмембранный белок. В конкретном варианте осуществления блокирующее средство представляет собой полипептид, который соответствует одному или более внеклеточным петлевым доменам, аминоконцевой и карбоксиконцевой части представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В конкретном варианте осуществления блокирующее средство может представлять собой полипептид, содержащий аминоконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В другом варианте осуществления блокирующее средство

может представлять собой полипептид, содержащий карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В одном варианте осуществления блокирующее средство может представлять собой полипептид, содержащий внеклеточный петлевой домен представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления блокирующее средство содержит внеклеточный домен представляющего интерес трансмембранного белка, такой как N-концевой внеклеточный домен, C-концевой внеклеточный домен и/или внеклеточный петлевой домен между одним или более пронизывающими мембрану доменами представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В другом варианте осуществления блокирующее средство представляет собой пептидную или полипептидную часть белка MSP, которую можно инкубировать с популяцией антителопродуцирующих клеток для обеспечения связывания между блокирующим средством и антителом, продуцируемым антителопродуцирующими клетками, которое специфически связывает эпитоп, расположенный на блокирующем средстве. В еще одном варианте осуществления блокирующее средство представляет собой обнаруживаемый маркер на основе пептида или полипептида, расположенный на представляющем интерес MSP или представляющем интерес трансмембранном белке, который можно инкубировать с популяцией антителопродуцирующих клеток для обеспечения связывания между блокирующим средством и антителом, продуцируемым антителопродуцирующими клетками, которое специфически связывает эпитоп, расположенный на блокирующем средстве.

[0142] В других вариантах осуществления способов отличное от человека животное или генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют частью представляющего интерес полноразмерного человеческого трансмембранного белка, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или их комбинацией (иммуногеном).

[0143] В некоторых вариантах осуществления спленоциты выделяют из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши), и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе полноразмерный человеческий трансмембранный белок, для обеспечения связывания между представляющим интерес полноразмерным трансмембранным белком (антигеном), презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым клетками. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп, расположенный на части антигена, являющегося представляющим интерес полноразмерным человеческим трансмембранным белком, который также соответствует аминокислотной последовательности или домену, присутствующему на иммуногене или кодируемому им.

[0144] В других вариантах осуществления способов отличное от человека животное или генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют частью представляющего интерес человеческого полноразмерного трансмембранного белка (иммуногена), последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или их комбинацией, выделяют спленоциты из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши) и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе часть человеческого трансмембранного белка, применяемого в качестве иммуногена, для

обеспечения связывания между эпитопом на части представляющего интерес человеческого трансмембранного белка (антигене), презентуемого комплексом, и антителом, продуцируемым клетками. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (например, Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на антигене, презентуемым комплексом.

[0145] В вариантах осуществления настоящих способов, которые включают применение части представляющего интерес трансмембранного белка, часть трансмембранного белка представляет собой пептид или полипептид, не предусматривающий представляющий интерес полноразмерный трансмембранный белок. В одном варианте осуществления часть представляющего интерес трансмембранного белка может представлять собой модифицированный трансмембранный белок, который не содержит один или более внеклеточных петлевых доменов, аминоконцевую и/или карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В конкретном варианте осуществления представляющий интерес модифицированный трансмембранный белок может представлять собой усеченный трансмембранный белок. В некоторых вариантах осуществления часть представляющего интерес трансмембранного белка предусматривает обнаруживаемую метку. В других вариантах осуществления часть представляющего интерес трансмембранного белка не предусматривает обнаруживаемую метку. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес усеченный трансмембранный белок содержит по меньшей мере всю трансмембранную часть представляющего интерес

трансмембранного белка. В определенных вариантах осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит аминоконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В другом варианте осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления усеченный белок содержит внеклеточный домен представляющего интерес трансмембранного белка, такой как N-концевой внеклеточный домен, C-концевой внеклеточный домен и/или внеклеточный петлевой домен между одним или более пронизывающими мембрану доменами представляющего интерес трансмембранного белка. В одном варианте осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит внеклеточный петлевой домен представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка.

[0146] В другом аспекте способов генетически сконструированное животное, которое не экспрессирует представляющий интерес трансмембранный белок с эндогенного гена, иммунизируют представляющим интерес отличным от человеческого трансмембранным белком или его частью, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей их, или их комбинацией.

[0147] Представляющий интерес отличный от человеческого трансмембранный белок и генетически сконструированное животное могут происходить от одного и того же или от отличающихся животных. Представляющий интерес отличный от человеческого трансмембранный белок может происходить из любого отличного от человека организма. Неограничивающие примеры отличных от человека организмов включают без ограничения отличные от человека млекопитающие, рептилии, рыбы, бактерии, насекомые и вирусы. В некоторых вариантах осуществления отличный от человеческого трансмембранный белок происходит от животного, такого как, например, мышь, крыса, коза, хомяк, свинья, шимпанзе, лошадь, овца, обезьяна и морская свинка. В конкретном варианте

осуществления отличное от человека животное представляет собой млекопитающее. В других вариантах осуществления отличный от человеческого трансмембранный белок происходит от мыши, крысы или козы. В конкретном варианте осуществления отличное от человека млекопитающее представляет собой мышь.

[0148] В конкретных вариантах осуществления способов генетически сконструированное животное представляет собой отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, которое иммунизировано представляющим интерес отличным от человеческого полноразмерным трансмембранным белком, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или их комбинацией (иммуногеном). Спленоциты выделяют из иммунизированного генетически сконструированного животного (например, крысы или мыши) и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который заключает в себе отличный от человеческого полноразмерный трансмембранный белок, для обеспечения связывания между представляющим интерес трансмембранным белком (антигеном), презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым клетками. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (например, Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на представляющем интерес отличным от человеческого полноразмерном трансмембранном белке.

[0149] В других вариантах осуществления способов генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют представляющим интерес отличным от человеческого полноразмерным трансмембранным белком, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или их комбинацией (иммуногеном), и спленоциты выделяют из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши), и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе представляющий интерес полноразмерный человеческий трансмембранный белок, для того, чтобы обеспечить связывание между представляющим интерес человеческим трансмембранным белком (антигеном), презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым клетками. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (например, Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют перекрестно-реагирующее антитело, которое связывает эпитоп на представляющем интерес отличным от человеческого полноразмерном трансмембранном белке и представляющем интерес отличным от человеческого трансмембранном белке.

[0150] В некоторых вариантах осуществления способов генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют представляющим интерес отличным от человеческого полноразмерным трансмембранным белком, последовательностью нуклеиновой

кислоты, кодирующей его, или их комбинацией (иммуногеном), и спленоциты выделяют из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши), и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе часть отличного от человеческого полноразмерного трансмембранного белка, такого как усеченный трансмембранный белок, для обеспечения связывания между эпитопом на части представляющего интерес трансмембранного белка (антигена), презентуемого комплексом, и антителом, продуцируемым клетками. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (например, Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на антигене, презентуемым комплексом.

[0151] В вариантах осуществления способов, которые предусматривают комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащий часть представляющего интерес трансмембранного белка, трансмембранный белок, презентуемый комплексом, не включает представляющий интерес полноразмерный трансмембранный белок. В одном варианте осуществления представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой усеченный трансмембранный белок, который не содержит один или более внеклеточных петлевых доменов, аминоконцевую и/или карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В

определенных вариантах осуществления представляющий интерес усеченный трансмембранный белок содержит по меньшей мере всю трансмембранную часть представляющего интерес трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления усеченный белок содержит внеклеточный домен представляющего интерес трансмембранного белка, такой как N-концевой внеклеточный домен, C-концевой внеклеточный домен и/или внеклеточный петлевой домен между одним или более пронизывающими мембрану доменами представляющего интерес трансмембранного белка. В конкретном варианте осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит аминоконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В другом варианте осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В одном варианте осуществления усеченный трансмембранный белок не содержит внеклеточный петлевой домен представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка.

[0152] В определенных вариантах осуществления способов генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют представляющим интерес отличным от человеческого полноразмерным трансмембранным белком, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или их комбинацией, спленоциты выделяют из иммунизированного животного и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе химерный трансмембранный белок, который содержит часть отличного от человеческого гомолога представляющего интерес трансмембранного белка и часть представляющего интерес человеческого трансмембранного белка, для того, чтобы обеспечить связывание между отличной от человеческой частью представляющего

интерес химерного трансмембранного белка (антигена), презентруемого комплексом, и антителом, продуцируемым клетками. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на отличной от человеческой части представляющего интерес химерного трансмембранного белка.

[0153] В вариантах осуществления способов, которые включают применение представляющего интерес химерного трансмембранного белка, химерный белок может содержать части представляющего интерес трансмембранного белка от двух отличающихся видов, как описано в данном документе. Например, химерный трансмембранный белок может содержать одну или более частей человеческого трансмембранного белка, функционально связанных с одной или более частями отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В некоторых случаях химерный трансмембранный белок содержит внеклеточный домен представляющего интерес трансмембранного белка, такой как N-концевой внеклеточный домен, C-концевой внеклеточный домен и/или внеклеточный петлевой домен между одним или более пронизывающими мембрану доменами представляющего интерес трансмембранного белка. Отличным от человеческого гомологом может быть гомолог любого отличного от человека животного, такого как, например, мышь, крыса, коза, хомяк, свинья, шимпанзе, лошадь, овца, обезьяна и морская свинка. В конкретном варианте осуществления отличное от человека млекопитающее представляет собой мышь, крысу или козу. В конкретном варианте осуществления отличное от человека млекопитающее представляет собой мышь.

[0154] В иллюстративных вариантах осуществления настоящих способов представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит один или более внеклеточных петлевых доменов из человеческого трансмембранного белка и

аминоконцевой домен и/или карбоксиконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В одном варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит один или более внеклеточных петлевых доменов и карбоксиконцевой домен из человеческого трансмембранного белка и аминоконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В другом варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит один или более внеклеточных петлевых доменов, и аминоконцевой домен из человеческого трансмембранного белка, и карбоксиконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В другом варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит аминоконцевой домен и карбоксиконцевой домен из человеческого трансмембранного белка и один или более внеклеточных петлевых доменов из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В одном варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит аминоконцевой домен из человеческого трансмембранного белка и один или более внеклеточных петлевых доменов и карбоксиконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В еще одном варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит один или более внеклеточных петлевых доменов из отличного от человеческого гомолога и аминоконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка.

[0155] В других вариантах осуществления способов генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют отличной от человеческой частью представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или их комбинацией (иммуногена).

[0156] В одном таком иллюстративном варианте осуществления спленоциты выделяют из иммунизированного генетически сконструированного животного и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе отличный от человеческого полноразмерный трансмембранный белок, для обеспечения связывания между представляющим интерес полноразмерным трансмембранным белком (антигеном), презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым клетками. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп, расположенный на части антигена, являющегося представляющим интерес отличным от человеческого полноразмерным трансмембранным белком, который также соответствует аминокислотной последовательности или домену, присутствующему на иммуногене или кодируемому им.

[0157] В других вариантах осуществления способов генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют частью представляющего интерес отличного от человеческого полноразмерного трансмембранного белка (иммуногена), последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или их комбинацией, выделяют спленоциты из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши) и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе часть

отличного от человеческого трансмембранного белка, применяемого в качестве иммуногена, для обеспечения связывания между эпитопом на части представляющего интерес человеческого трансмембранного белка (антигене), презентуемого комплексом, и антителом, продуцируемым клетками. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на антигене, презентуемым комплексом.

[0158] В другом аспекте способов генетически сконструированное животное, которое не экспрессирует представляющий интерес трансмембранный белок с эндогенного гена, иммунизируют представляющим интерес химерным трансмембранным белком или нуклеиновой кислотой, кодирующей его.

[0159] В случаях, которые включают применение представляющего интерес химерного трансмембранного белка, химерный белок может содержать части представляющего интерес трансмембранного белка от двух отличающихся видов, как описано в данном документе. Например, химерный трансмембранный белок может содержать одну или более частей человеческого трансмембранного белка, функционально связанных с одной или более частями отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В некоторых случаях представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит внеклеточный домен представляющего интерес человеческого трансмембранного белка, такой как N-концевой внеклеточный домен, C-концевой внеклеточный домен и/или внеклеточный петлевой домен, функционально связанный с одним или более пронизывающими мембрану доменами представляющего интерес

трансмембранного белка. Отличным от человеческого гомологом может быть гомолог любого отличного от человека животного, такого как, например, мышь, крыса, коза, хомяк, свинья, шимпанзе, лошадь, овца, обезьяна и морская свинка. В конкретном варианте осуществления отличное от человека млекопитающее представляет собой мышь, крысу или козу. В конкретном варианте осуществления отличное от человека млекопитающее представляет собой мышь.

[0160] В иллюстративных вариантах осуществления настоящих способов представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит один или более внеклеточных петлевых доменов из представляющего интерес человеческого трансмембранного белка и аминоконцевой домен и/или карбоксиконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В одном варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит один или более внеклеточных петлевых доменов и карбоксиконцевой домен из человеческого трансмембранного белка и аминоконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В другом варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит один или более внеклеточных петлевых доменов, и аминоконцевой домен из человеческого трансмембранного белка, и карбоксиконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В другом варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит аминоконцевой домен и карбоксиконцевой домен из человеческого трансмембранного белка и один или более внеклеточных петлевых доменов из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В одном варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок содержит аминоконцевой домен из человеческого трансмембранного белка и один или более внеклеточных петлевых доменов и карбоксиконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка. В еще одном варианте осуществления представляющий интерес химерный трансмембранный белок

содержит один или более внеклеточных петлевых доменов из отличного от человеческого гомолога, функционально связанных с трансмембранным доменом, и аминоконцевой домен из отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка.

[0161] В одном конкретном варианте осуществления способов генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют химерным трансмембранным белком, который содержит часть человеческого трансмембранного белка и часть отличного от человеческого гомолога трансмембранного белка, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или их комбинацией, выделяют спленоциты из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши) и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе представляющий интерес полноразмерный человеческий трансмембранный белок (антиген), для обеспечения связывания между антигеном человека, презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым клетками, специфическим в отношении человеческой части представляющего интерес химерного трансмембранного белка. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на человеческой части представляющего интерес химерного трансмембранного белка.

[0162] В другом варианте осуществления способов генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют химерным трансмембранным белком, который содержит

часть представляющего интерес человеческого трансмембранного белка и часть отличного от человеческого гомолога представляющего интерес трансмембранного белка, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или их комбинацией, выделяют спленоциты из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши) и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе часть представляющего интерес полноразмерного человеческого трансмембранного белка (антигена), для обеспечения связывания между антигеном человека, презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым клетками, специфическим в отношении человеческой части представляющего интерес химерного трансмембранного белка. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на человеческой части представляющего интерес химерного трансмембранного белка.

[0163] В еще одном варианте осуществления способов генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют химерным трансмембранным белком, который содержит часть представляющего интерес человеческого трансмембранного белка и часть отличного от человеческого гомолога представляющего интерес трансмембранного белка, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или их комбинацией, выделяют спленоциты из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши) и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для

идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе представляющий интерес отличный от человеческого полноразмерный трансмембранный белок (антиген), для обеспечения связывания между отличным от человеческого антигеном, презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым клетками, специфическим в отношении отличной от человеческой части представляющего интерес химерного трансмембранного белка. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на отличной от человеческой части представляющего интерес химерного трансмембранного белка.

[0164] В другом варианте осуществления способов генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют химерным трансмембранным белком, который содержит часть представляющего интерес человеческого трансмембранного белка и часть отличного от человеческого гомолога представляющего интерес трансмембранного белка, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или их комбинацией, выделяют спленоциты из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши) и инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки также инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе часть представляющего интерес отличного от человеческого полноразмерного трансмембранного белка (антигена), для обеспечения связывания между отличным от человеческого антигеном, презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым клетками,

специфическим в отношении отличной от человеческой части представляющего интерес химерного трансмембранного белка. Затем клетки можно промывать. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на отличной от человеческой человеческой части представляющего интерес химерного трансмембранного белка.

[0165] В другом аспекте способов отличное от человека животное или генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себя представляющий интерес полноразмерный трансмембранный белок или его часть.

[0166] В некоторых вариантах осуществления способов отличное от человека животное или генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себя представляющий интерес полноразмерный человеческий трансмембранный белок. Спленциты выделяют из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши) и инкубируют со множеством блокирующих средств, которые соответствуют каждому из белков MSP, включенных в комплекс, и каждому обнаруживаемому маркеру, включенному в комплекс или прикрепленному к представляющему интерес трансмембранному белку, такому как His-метка или FLAG-метка, для обеспечения связывания между блокирующими средствами и антителом, продуцируемым клетками, которое специфически связывается с эпитопом, расположенным на блокирующем средстве. Клетки также инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки затем

инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который заключает в себе полноразмерный человеческий трансмембранный белок, для обеспечения связывания между представляющим интерес полноразмерным трансмембранным белком (антигеном), презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым оставшимися несвязанными клетками в популяции. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки можно промывать с исключением из результатов сортировки всех клеток, связанных с блокирующим(-ими) средством(-ами), а также несвязанного и избыточного PE-стрептавидина и меченых антител к маркеру В-клеток. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на представляющем интерес полноразмерном человеческом трансмембранном белке.

[0167] В одном варианте осуществления способов отличное от человека животное или генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, иммунизируют комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который заключает в себе представляющий интерес полноразмерный человеческий трансмембранный белок. Спленоциты выделяют из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши) и инкубируют со множеством блокирующих средств, которые соответствуют каждому из белков MSP, включенных в комплекс, и каждому обнаруживаемому маркеру, включенному в комплекс или прикрепленному к представляющему интерес трансмембранному белку, такому как His-метка или FLAG-метка, для обеспечения связывания между блокирующими средствами и

антителом, продуцируемым клетками, которое специфически связывается с эпитопом, расположенным на блокирующем средстве. Клетки также инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченным флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки затем инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе часть человеческого трансмембранного белка, для обеспечения связывания между частью представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка (антигеном), презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым оставшимися несвязанными клетками в популяции. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки можно промывать с исключением из результатов сортировки всех клеток, связанных с блокирующим(-ими) средством(-ами), а также несвязанного и избыточного PE-стрептавидина и меченых антител к маркеру В-клеток. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на части представляющего интерес полноразмерного человеческого трансмембранного белка, презентруемого комплексом.

[0168] В других вариантах осуществления способов генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или крыса, которое не экспрессирует представляющий интерес трансмембранный белок с эндогенного гена, иммунизируют комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе представляющий интерес отличный от человеческого полноразмерный трансмембранный белок. Спленоциты выделяют из иммунизированного отличного от человека животного (например, крысы или мыши)

и инкубируют со множеством блокирующих средств, которые соответствуют каждому из белков MSP, включенных в комплекс, и каждому обнаруживаемому маркеру, включенному в комплекс или прикрепленному к представляющему интерес трансмембранному белку, такому как His-метка или FLAG-метка, для обеспечения связывания между блокирующими средствами и антителом, продуцируемым клетками, которое специфически связывается с эпитопом, расположенным на блокирующем средстве. Клетки также инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченым флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Клетки затем инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который включает в себе отличный от человеческого полноразмерный трансмембранный белок, для обеспечения связывания между представляющим интерес полноразмерным трансмембранным белком (антигеном), презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым оставшимися несвязанными клетками в популяции. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки можно промывать с исключением из результатов сортировки всех клеток, связанных с блокирующим(-ими) средством(-ами), а также несвязанного и избыточного PE-стрептавидина и меченых антител к маркеру В-клеток. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на представляющем интерес отличном от человеческого полноразмерном трансмембранном белке.

[0169] В некоторых вариантах осуществления способов генетически сконструированное отличное от человека животное, такое как, например, мышь или

крыса, которое не экспрессирует представляющий интерес трансмембранный белок с эндогенного гена, иммунизируют комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который заключает в себе заключает в себе часть представляющего интерес отличного от человеческого полноразмерного трансмембранного белка. Спленоциты выделяют из иммунизированного животного и инкубируют со множеством блокирующих средств, которые соответствуют каждому из белков MSP, включенных в комплекс, и каждому обнаруживаемому маркеру, включенному в комплекс или прикрепленному к части представляющего интерес отличного от человеческого трансмембранного белка, такому как His-метка или FLAG-метка, для обеспечения связывания между блокирующими средствами и антителом, продуцируемым клетками, которое специфически связываются с эпитопом, расположенным на блокирующем средстве. Клетки также инкубируют с мечеными антителами к маркеру В-клеток (например, меченным флуорохромом антителом к IgG) для идентификации популяции В-клеток. Затем клетки инкубируют с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, который заключает в себе часть отличного от человеческого полноразмерного трансмембранного белка или представляющий интерес отличный от человеческого полноразмерный трансмембранный белок (антиген), для обеспечения связывания между представляющим интерес трансмембранным белком, презентруемым комплексом, и антителом, продуцируемым оставшимися несвязанными клетками в популяции. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки можно промывать с исключением из результатов сортировки всех клеток, связанных с блокирующим(-ими) средством(-ами), а также несвязанного и избыточного PE-стрептавидина и меченых антител к маркеру В-клеток. Флуоресценция PE и сигналы от связанных В-клеток (например, сигналы от меченных флуорохромом антител к IgG) могут быть

обнаружены посредством FACS для идентификации и сбора гомогенной популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает эпитоп на части представляющего интерес отличного от человеческого полноразмерного трансмембранного белка.

[0170] В вариантах осуществления способов, которые включают применение блокирующего средства, блокирующее средство может содержать любую молекулу, такую как, например, пептид, полипептид, химическое соединение. В таких вариантах осуществления блокирующее средство может представлять собой полипептид или пептид, который соответствует части представляющего интерес трансмембранного белка, полипептид или полипептид, который соответствует части белка MSP, или обнаруживаемый маркер, такой как His-метка или FLAG-метка. В некоторых вариантах осуществления блокирующее средство предусматривает обнаруживаемую метку. В других вариантах осуществления блокирующее средство не предусматривает обнаруживаемую метку. В одном варианте осуществления блокирующее средство представляет собой пептидную или полипептидную часть представляющего интерес трансмембранного белка, которую можно инкубировать с популяцией антителопродуцирующих клеток для обеспечения связывания между блокирующим средством и антителом, продуцируемым антителопродуцирующими клетками, которое специфически связывает эпитоп, расположенный на блокирующем средстве. В одном варианте осуществления блокирующее средство представляет собой представляющий интерес усеченный трансмембранный белок. В конкретном варианте осуществления блокирующее средство представляет собой полипептид, который соответствует одному или более внеклеточным петлевым доменам, аминоконцевой и карбоксиконцевой части представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В конкретном варианте осуществления блокирующее средство может представлять собой полипептид, содержащий аминоконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В другом варианте осуществления блокирующее средство

может представлять собой полипептид, содержащий карбоксиконцевую часть представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В одном варианте осуществления блокирующее средство может представлять собой полипептид, содержащий внеклеточный петлевой домен представляющего интерес полноразмерного трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления блокирующее средство представляет собой усеченный белок, который содержит внеклеточный домен представляющего интерес трансмембранного белка, такой как N-концевой внеклеточный домен, C-концевой внеклеточный домен и/или внеклеточный петлевой домен между одним или более пронизывающими мембрану доменами представляющего интерес трансмембранного белка. В другом варианте осуществления блокирующее средство представляет собой пептидную или полипептидную часть белка MSP, которую можно инкубировать с популяцией антителопродуцирующих клеток для обеспечения связывания между блокирующим средством и антителом, продуцируемым антителопродуцирующими клетками, которое специфически связывает эпитоп, расположенный на блокирующем средстве. В еще одном варианте осуществления блокирующее средство представляет собой обнаруживаемый маркер на основе пептида или полипептида, расположенный на представляющем интерес MSP или представляющем интерес трансмембранном белке, который можно инкубировать с популяцией антителопродуцирующих клеток для обеспечения связывания между блокирующим средством и антителом, продуцируемым антителопродуцирующими клетками, которое специфически связывает эпитоп, расположенный на блокирующем средстве.

[0171] Раскрываемые способы включают обнаружение, сортировку и сбор антителопродуцирующих клеток, которые связаны с антигеном, презентруемым комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающим в себе представляющий интерес трансмембранный белок. Обнаружение, сортировка и сбор могут быть объединены или проводиться как отдельные стадии. Обнаружение,

сортировка и/или сбор могут включать идентификацию клеток, связанных представляющим интерес трансмембранным белком, презентуемым комплексом, посредством обнаружения одной или более обнаруживаемых меток в комплексе. Затем связанные клетки можно отделить от несвязанных клеток (т. е. сортировать) и отобрать для дальнейшего применения.

[0172] В некоторых вариантах осуществления взаимодействие между антителопродуцирующими клетками и комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующий представляющий интерес трансмембранный белок, обнаруживают по конформационному изменению представляющего интерес трансмембранного белка, активации или дезактивации представляющего интерес трансмембранного белка в клетке или путем применения обнаруживаемых меток (например, флуоресцентных молекул, FLAG-метки, His-метки) для идентификации и захвата клеток, связанных с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащим представляющий интерес трансмембранный белок. Обнаружение можно проводить путем иммунного окрашивания с помощью антитела, специфического в отношении метки, или прямого окрашивания с помощью реагента, который связывается с меткой. Из уровня техники хорошо известны многочисленные наборы и методики для обнаружения.

[0173] В определенных вариантах осуществления способов клетки промывают буфером в течение определенного периода времени, составляющего от приблизительно 5 минут до приблизительно 60 минут, для удаления несвязанного антигена; можно применять несколько промываний общей продолжительностью от 10 до 120 минут, например, 3 промывания, продолжительностью 10 минут или одно 30-минутное промывание; 2—4 промывания продолжительностью 10—15 минут каждое. В одном варианте осуществления можно применять промывание клеток в течение определенного периода времени, составляющего одно (1) промывание продолжительностью приблизительно 10 минут, или приблизительно 15 минут, или приблизительно 20 минут, или приблизительно 25 минут, или приблизительно

30 минут, или приблизительно 35 минут, или приблизительно 40 минут, или приблизительно 45 минут, или приблизительно 50 минут, или приблизительно 55 минут, или всего приблизительно 60 минут. В некоторых вариантах осуществления можно применять промывание клеток в течение определенного периода времени, составляющего два (2) промывания, каждое продолжительностью приблизительно 5 минут, или приблизительно 10 минут, или приблизительно 15 минут, или приблизительно 20 минут, или приблизительно 25 минут, или приблизительно 30 минут на промывание. Предусматриваются дополнительные интервалы промывания, по существу эквивалентные интервалам, описанным в данном документе.

[0174] В некоторых вариантах осуществления обнаружение, сортировку и сбор можно проводить с применением сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) для обнаружения, сортировки и отбора отдельных антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, специфическое в отношении трансмембранного белка. Протоколы выделения отдельных клеток посредством проточной цитометрии хорошо известны (Huang, J. et al, 2013, выше). Например, клетки, которые связывают антиген, презентруемый меченым (например, флуоресцентной меткой) комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок (или флуоресцентно-меченым стрептавидином/биотинилированным антигеном), могут быть обнаружены и идентифицированы как клетки, которые экспрессируют антитела, которые специфически связывают антиген (т. е. представляющий интерес трансмембранный белок), а затем собраны в отдельные лунки в 96-луночных или 384-луночных планшетах.

[0175] После сбора отдельные антителопродуцирующие клетки могут быть размножены обычными методиками культивирования клеток для последующего получения ДНК. Альтернативно, гены антител можно амплифицировать

непосредственно из отдельных антителопродуцирующих клеток и впоследствии клонировать в векторы ДНК.

[0176] Отдельные антителопродуцирующие клетки могут быть подвергнуты сортировке и собраны альтернативными способами, известными из уровня техники, включая без ограничения ручной сбор отдельных клеток, ограниченное разбавление и пэннинг В-клеток адсорбированного антигена, которые все хорошо известны из уровня техники. См., например, Rolink et al., J Exp Med (1996)183:187-194; Lightwood, D. et al, J. Immunol. Methods (2006) 316(1-2):133-43.

Создание антител из нуклеиновых кислот, полученных из антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело к представляющему интерес трансмембранному белку.

[0177] Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его фрагмент, может быть выделена из антителопродуцирующих клеток, созданных и полученных с применением описанных в данном документе способов.

[0178] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует фрагмент антитела, такой как вариабельный домен, константный домен или их комбинация. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, выделенная из антителопродуцирующей клетки, кодирует вариабельный домен антитела. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь антитела или ее фрагмент. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь антитела или ее фрагмент.

[0179] В определенных случаях обеспечивают экспрессию в клетках-хозяевах нуклеиновой кислоты, выделенной из антителопродуцирующей клетки. Например, нуклеиновая кислота, выделенная из антителопродуцирующих клеток, может быть экспрессирована (например, клонирована и воспроизведена рекомбинантно) в клетках-хозяевах, таких как клетки млекопитающих, бактериальные клетки или клетки насекомых. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева

культивируют в условиях, при которых экспрессируется нуклеиновая кислота, после чего можно получить антитело или его часть и выделить для дальнейшего применения. Способы получения антител из выделенных нуклеиновых кислот хорошо известны из уровня техники, и любой такой способ можно применять в сочетании с настоящим изобретением.

[0180] В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, содержащие одну или более из указанных выше нуклеиновых кислот, культивируют в условиях, при которых экспрессируется полноразмерное антитело, после чего антитело можно продуцировать и выделить для дальнейшего применения. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует переменный домен антитела, и клетку культивируют в условиях, при которых экспрессируется переменный домен. В других вариантах осуществления клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует переменный домен тяжелой цепи (V_H) антитела, и клетку культивируют в условиях, при которых экспрессируется V_H -домен. В другом варианте осуществления клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует переменный домен легкой цепи (V_L) антитела, и клетку культивируют в условиях, при которых экспрессируется V_L -домен. В конкретных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует V_H -домен антитела, и нуклеиновую кислоту, которая кодирует V_L -домен антитела, и клетку культивируют в условиях, при которых экспрессируются V_H -домен и V_L -домен.

[0181] В некоторых вариантах осуществления ДНК можно выделить из хозяина для рекомбинантного получения антител. В целом, гены или нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области тяжелой и переменной области легкой цепей иммуноглобулина (т. е. V_H , V_L , V_K и V_λ), можно выделить с применением протоколов RT-PCR с нуклеиновыми кислотами, выделенными из антителопродуцирующих клеток. Такие протоколы RT-PCR являются хорошо

известными и общепринятыми методиками, как описано, например, в Wang et al., *J. Immunol. Methods* (2000) 244:217-225, и описаны в данном документе.

[0182] После выделения гены или нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, можно клонировать в векторы экспрессии на основе тяжелой и легкой цепи IgG и экспрессировать посредством трансфекции клеток-хозяев. Например, гены или нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, можно встраивать в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии (стабильной или транзientной) в клетках. Доступны многие векторы, в частности, векторы экспрессии, или их можно сконструировать так, чтобы они содержали соответствующие регуляторные элементы, требуемые для модулирования экспрессии гена или нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело.

[0183] Вектор экспрессии в контексте настоящего изобретения может представлять собой любой подходящий вектор, включая хромосомные, нехромосомные и синтетические векторы на основе нуклеиновой кислоты (последовательность нуклеиновой кислоты, включающая подходящий набор элементов контроля экспрессии), как описано в данном документе. Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, дрожжевые плазмиды, векторы, происходящие из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, и векторы на основе вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК).

[0184] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты включена в вектор на основе депротенизированной ДНК или РНК, включая, например, линейный элемент экспрессии (как описано, например, в Sykes and Johnston, *Nat Biotech* (1997) 12:355-59), компактный вектор на основе нуклеиновой кислоты (как описано, например, в US 6077835) или плазмидный вектор, такой как pBR322 или pUC 19/18. Такие векторы на основе нуклеиновой кислоты и их

применение хорошо известны из уровня техники. См., например, US 5589466 и US 5973972.

[0185] В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии может представлять собой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Можно использовать любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящие векторы включают, например, векторы, содержащие конститутивные или индуцируемые промоторы, такие как альфа-фактор дрожжей, алкогольоксидаза и PGH. См. F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987); и Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987).

[0186] В определенных вариантах осуществления вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты (или ген), кодирующую тяжелую цепь антитела, и молекулу нуклеиновой кислоты (или ген), кодирующую легкую цепь антитела, где антитело продуцируется антителопродуцирующей клеткой, которая была получена посредством способа по настоящему изобретению. В целом, используемый вектор предусматривает вектор экспрессии, содержащий описанные молекулы нуклеиновой кислоты (или гены), где молекула нуклеиновой кислоты (или ген) функционально связана с последовательностью контроля экспрессии, подходящей для экспрессии в клетке-хозяине.

[0187] Выбор вектора частично зависит от применяемой клетки-хозяина. Клетки-хозяева включают без ограничения клетки либо прокариотического, либо эукариотического (обычно млекопитающих) происхождения.

[0188] Следует понимать, что последовательность нуклеиновой кислоты или ген полноразмерного антитела можно впоследствии клонировать в соответствующий вектор или векторы. Альтернативно, Fab-область выделенного антитела можно клонировать в вектор или векторы наряду с константными областями любого изотипа. Следовательно, при конструировании выделенных

антител можно использовать любую константную область, включая константные области тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD и IgE или константные области химерной тяжелой цепи. Такие константные области можно получить от человека или животного любого вида в зависимости от предполагаемого применения антител. Кроме того, переменные области антител или Fab-область можно клонировать в соответствующем(-их) векторе(-ах) для экспрессии белка в других форматах, таких как ScFv, диатело и т. п.

[0189] В связи с этим в настоящем изобретении также предусмотрена клетка-хозяина млекопитающего, кодирующая молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую полноразмерное антитело, специфическое в отношении представляющего интерес трансмембранного белка, где нуклеиновая кислота или ген, кодирующие антитело выделены из антителопродуцирующей клетки, полученной в соответствии с настоящими способами. В одном варианте осуществления первичная антителопродуцирующая клетка представляла собой В-клетку, выделенную из гетерогенной популяции клеток, полученных от иммунизированного млекопитающего.

[0190] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой бактериальную или дрожжевую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В других вариантах осуществления клетка-хозяин может представлять собой, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO), такие как клетки CHO K1, DXB-11 CHO, клетки Veggie-CHO; COS (например, COS-7); стволовую клетку; клетки сетчатки; клетку Vero; клетку CV1; клетку почки, такую как, например, клетка HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, aHaK, клетка BHK21; клетку HeLa; клетку HepG2; WI38; MRC 5; Colo25; HB 8065; HL-60; клетку Jurkat или клетку Daudi; клетку A431 (эпидермальную); CV-1, U937, 3T3 или L-клетку; клетку C127, клетку SP2/0, NS-0 или MMT, опухолевую клетку и линию клеток, полученную из любой из вышеупомянутых клеток. В конкретном варианте осуществления клетка-

хозяин представляет собой клетку CHO. В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку CHO K1.

[0191] Антитело и антитела, в том смысле, как данные термины известны в данной области техники, относятся к антигенсвязывающим белкам иммунной системы. Термин «антитело», как упоминается в данном документе, включает целые полноразмерные антитела, имеющие антигенсвязывающую область, и любой их фрагмент, в котором сохраняется «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающая область», или отдельные цепи, например, их одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). «Полноразмерное антитело» представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (CL). Константная область легкой цепи состоит из одного CL-домена. V_H - и V_L -области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном.

[0192] Как показано в данном документе, настоящее изобретение можно применять для получения антител, которые связываются с представляющим интерес трансмембранным белком. Антитела, полученные от антителопродуцирующих клеток, как описано в данном документе, могут быть охарактеризованы с применением способов, известных из уровня техники. Например, можно определить

аффинность связывания, распознавание специфического эпитопа или функциональную способность любого из полученных в данном документе антител.

[0193] «Аффинность связывания» обычно относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между отдельным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, применяемый в данном документе термин «аффинность связывания» относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между представителями пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы к ее партнеру по связыванию обычно может быть представлена равновесной константой диссоциации (K_D или K_D). Существует обратная зависимость между значением K_D (молярная, M) и аффинностью связывания, поэтому, чем меньше значение K_D (M), тем выше аффинность связывания молекулы с ее связывающим эпитопом.

[0194] Термины «более высокая аффинность» или «высокая аффинность» относятся к антителу, которое обычно сильнее и/или быстрее связывает антиген и/или дольше остается связанным. В целом, для высокоаффинного антитела требуется более низкая концентрация (M) антигена для достижения требуемого эффекта по причине сильного связывающего взаимодействия. И наоборот, термины «низкая аффинность» и «более низкая аффинность» представляют собой термины, применяемые для обозначения более слабого связывания, такого как сниженная способность к образованию взаимодействия между молекулой и ее партнером по связыванию по сравнению с другими связывающими молекулами (например, антителами). Таким образом, связывающие молекулы с низкой аффинностью будут иметь большее значение K_D по сравнению с другими связывающими молекулами и/или будут медленно связывать антиген и склонны легко диссоциировать.

[0195] Термин « k_d » (сек⁻¹ или 1/с) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константе

скорости диссоциации связывания антитела, Ig, антителосвязывающего фрагмента или молекулярного взаимодействия. Указанное значение также обозначается как значение $k\text{-off}$.

[0196] Термин « k_a » ($M^{-1} \times \text{сек}^{-1}$ или $1/M$) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константе скорости ассоциации антитела, Ig, антителосвязывающего фрагмента или молекулярного взаимодействия.

[0197] Термин « K_D » или « K_D » (M) относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или к равновесной константе диссоциации антитела, Ig, антителосвязывающего фрагмента или молекулярного взаимодействия. Равновесную константу диссоциации получают путем деления k_a на k_d .

[0198] Из уровня техники известны различные способы измерения аффинности связывания, любой из которых можно применять для целей настоящего изобретения. Например, аффинность связывания антитела с антигеном можно измерить посредством поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™, или посредством определения аффинности в растворе с использованием ELISA.

[0199] В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с представляющим интерес трансмембранным белком придает функциональную активность в клетке (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*), в которой экспрессируется трансмембранный белок, или связывание антитела с представляющим интерес трансмембранным белком модулирует нормальную функциональную активность представляющего интерес трансмембранного белка в присутствии или в отсутствие эндогенного лиганда представляющего интерес трансмембранного белка.

[0200] В определенных вариантах осуществления антитело к представляющему интерес трансмембранному белку представляет собой антагонист

функции трансмембранного белка. Антитело-антагонист означает антитело, направленное против активного сайта антигена (т. е. представляющего интерес трансмембранного белка), и которое способно подавлять активность трансмембранного белка или активность природного лиганда самого трансмембранного белка. Например, связывание антитела с антигеном снизит или будет препятствовать эндогенной функции представляющего интерес трансмембранного белка. В одном неограничивающем примере антитело-антагонист может связываться с представляющим интерес трансмембранным белком и модулировать функцию трансмембранного белка, препятствуя связыванию лиганда с трансмембранным белком, активации рецептора и т. п.

[0201] В еще одном варианте осуществления антитело к представляющему интерес трансмембранному белку представляет собой агонист трансмембранного белка. Антитело-антагонист означает антитело, способное активировать представляющий интерес трансмембранный белок (т. е. антиген) в отсутствие самого нативного лиганда, при этом антитело-антагонист может индуцировать функциональную активность представляющего интерес трансмембранного белка. Например, связывание антитела с антигеном может индуцировать или усиливать эндогенную функцию представляющего интерес трансмембранного белка. В одном неограничивающем примере антитело-антагонист может связываться с представляющим интерес трансмембранным белком и может модулировать функцию трансмембранного белка путем активации белка или рецептора, например, путем изменения конформации белка.

[0202] Анализы для измерения связывания антител и функции трансмембранных белков хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, анализы для измерения интернализации трансмембранного белка, конформационных изменений, фосфорилирования, связывания лиганда и т. п. хорошо известны из уровня техники.

[0203] Настоящее описание дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует понимать как ограничивающие каким-либо образом. Содержание всех приведенных ссылок (включая ссылки на литературу, выданные патенты и опубликованные заявки на патенты, приводимые в настоящей заявке) явным образом включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Создание и сбор антителопродуцирующих клеток

[0204] Как показано в таблице 1, для сравнения инициировали несколько кампаний иммунизации для того, чтобы создать иммунный ответ у мышей и создать клетки, которые продуцировали антитело к представляющему интерес антигену (антителопродуцирующие клетки). Затем антителопродуцирующие клетки собирали в соответствии с описанными в данном документе способами.

[0205] В целом, мышей иммунизировали путем инъекции иммуногена, такого как, например, ДНК, кодирующая представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, представляющий интерес очищенный трансмембранный белок или его часть, комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащий представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, вирусоподобная частица (VLP), содержащая представляющий интерес трансмембранный белок, или цепь экспрессирующей ДНК, кодирующая представляющий интерес трансмембранный белок, или их комбинация. В некоторых случаях иммуноген представлял собой человеческий трансмембранный белок или кодирующую его ДНК. В других случаях мышей иммунизировали представляющим интерес химерным трансмембранным белком, усеченной формой трансмембранного белка, представляющим интерес модифицированным трансмембранным белком или ДНК, кодирующей их.

[0206] Трансмембранные белки для применения в способах, описанных в данном документе, создавали следующим образом. В целом, нуклеотидную последовательность, кодирующую трансмембранный белок, модифицировали с включением FLAG-метки и гистидиновой метки (10xHis-метки), прикрепленных к карбоксиконцу трансмембранного белка. Обеспечивали экспрессию модифицированной нуклеотидной последовательности в клетках Sf9 или Expi293 (Thermo Fisher Scientific). Затем клетки сольубилизировали с применением детергента N-додецил- β -D-мальтозида (DDM) и центрифугировали с получением растворимой в детергенте фракции, содержащей модифицированные трансмембранные белки. Затем модифицированные белки выделяли из фракции, растворимой в детергенте, путем аффинной очистки с помощью аффинных гранул к FLAG, которые связывали модифицированные трансмембранные белки. Затем аффинные гранулы и белки промывали и связанные трансмембранные белки элюировали и собирали. Выделение очищенного трансмембранного белка подтверждали посредством гель-электрофореза SDS-PAGE и вестерн-блоттинга.

[0207] Образовывали комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, в которые встроен очищенный трансмембранный белок. Очищенный трансмембранный белок включали в детергентную смесь, состоящую из DDM и трис-соли гемисукцината холестерина (CHS). Данную смесь трансмембранного белка и детергента объединяли со смесью мембранного каркасного белка и липидов 1 к 130, содержащей модифицированный мембранный каркасный белок MSP1E3D1, который включает метку Bir-A на карбоксиконце для биотинилирования и фосфатидилхолиновые (1-пальмитоил-2-олеоилглицеро-3-фосфохолиновые) липиды, которые растворяли в детергентном буфере на основе холата натрия, с получением конечной смеси, состоящей из трансмембранного белка, детергента, мембранного каркасного белка, липидов и буфера, содержащего соотношение 1 часть очищенного трансмембранного белка к 20 частям мембранных каркасных белков. Затем детергент экстрагировали из конечной смеси с применением гранул

для облегчения сборки комплексов дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок, в которые встроен отдельный представляющий интерес трансмембранный белок. Комплексы дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок, в которые встроен представляющий интерес трансмембранный белок, затем отделяли от комплексов дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок, которые не включали представляющий интерес трансмембранный белок, с применением аффинной очистки с помощью 10x-his-метки и/или эксклюзионной хроматографии с получением комплексов дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок, в которые встроен представляющий интерес трансмембранный белок, для дальнейшего применения.

[0208] Мыши, подлежащие иммунизации, различались. В определенных когортах мыши были генетически сконструированы так, чтобы представляющий интерес трансмембранный белок не экспрессировался с эндогенного гена. В других когортах мыши представляли собой мышей дикого типа, которые экспрессировали мышинный гомолог представляющего интерес трансмембранного белка. В некоторых когортах мыши были генетически сконструированы так, как изложено в патентах США №№ 8502018, 8642835, 8697940, 8791323, 9226484 и WO 2019/113065; все из которых во всей своей полноте включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых когортах иммунизированные генетически сконструированные мыши представляли собой мышей VELOCIMMUNE[®], (Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Тарритаун, Нью-Йорк) как описано, например, в патентах США № 8502018 и/или 8642835, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки. В целом, мыши VELOCIMMUNE[®], применяемые для иммунизации, содержат ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина (IgH) и переменные области легкой цепи человеческого иммуноглобулина, и могут также не иметь эндогенного мышинового гена, кодирующего представляющий интерес трансмембранный белок. В конкретных когортах иммунизировали мышей VELOCIMMUNE[®], которые

содержали гуманизированный локус IgH и/или гуманизированный локус Igk. В некоторых когортах иммуноген путем инъекции вводили генетически сконструированным мышам, содержащим ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина и вариабельные области легкой лямбда-цепи (Ig λ) иммуноглобулина, в которых отсутствует эндогенный мышинный ген, кодирующий представляющий интерес трансмембранный белок.

[0209] Осуществляли мониторинг гуморального иммунного ответа посредством анализа связывания клеток с применением клеток, сконструированных для экспрессии представляющего интерес трансмембранного белка или его части. Как только у иммунизированных мышей был идентифицирован требуемый иммунный ответ, собирали их селезенки. Получали спленоциты и путем лизиса удаляли эритроциты.

[0210] В случаях, когда обеспечивали образование гибридом и их применяли, собирали спленоциты и сливали их с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и получения линии клеток гибридомы. Затем линии клеток гибридомы подвергали скринингу и отбирали для идентификации линий клеток, которые продуцируют антитела к представляющему интерес трансмембранному белку.

[0211] Также выделяли антителопродуцирующие клетки с антиген-положительными В-клетками. После иммунизации мышей собирали их селезенки. Получали спленоциты и путем лизиса удаляли эритроциты. Затем спленоциты окрашивали мечеными флуорохромом антителами, специфическими в отношении маркера поверхности В-клеток, такому как IgG, для идентификации В-клеток.

[0212] В целом, популяцию антителопродуцирующих В-клеток затем идентифицируют путем приведения В-клеток в контакт с известным сортирующим средством, таким как очищенный трансмембранный белок или его часть, представляющий интерес химерный трансмембранный белок, представляющий

интерес усеченный трансмембранный белок, представляющий интерес трансмембранный белок в VLP или экзосоме или комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, в который встроен представляющий интерес трансмембранный белок или его часть, для того, чтобы обеспечить связывание представляющего интерес трансмембранного белка с антителом, присутствующим на поверхности В-клетки. Связанные В-клетки затем собирали с применением FACS с получением популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитело к представляющему интерес трансмембранному белку. В образцах без комплекса (контрольных) проводили сортировку пептидов или вирусоподобных частиц (VLP) посредством FACS для получения антителопродуцирующих В-клеток из гетерогенной популяции В-клеток. В образцах с комплексом сортировку проводили с флуоресцентно мечеными комплексами посредством FACS с получением антителопродуцирующих В-клеток. В этот момент В-клетки инкубировали с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащим представляющий интерес трансмембранный белок. Затем клетки промывали для удаления несвязанного комплекса. Впоследствии клетки инкубировали с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки промывали в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) для удаления избыточного PE-стрептавидина. Флуоресценцию PE образцов В-клеток анализировали посредством FACS для идентификации популяции клеток, которые экспрессируют антитела, которые связываются с представляющим интерес трансмембранным белком.

Пример 2. Получение антител из популяции антителопродуцирующих клеток

[0213] В качестве сравнения, антитела выделяли для скрининга либо посредством традиционной гибридомной методики, либо посредством методики

сортировки клеток с или без комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок. Отдельные клетки из популяции антителопродуцирующих В-клеток выделяли в отдельных лунках в 384-луночных планшетах. RT-PCR генов антител из таких выделенных антителопродуцирующих В-клеток проводили согласно способу, описанному в Wang and Stollar *Journal of Immunological Methods* (2000) 244: 217–225, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Вкратце, молекулы кДНК для каждой отдельной антителопродуцирующей В-клетки синтезировали с помощью реакции с обратной транскриптазой (RT) (SuperscriptTM III, Invitrogen). Затем каждый полученный продукт RT разделяли и переносили в две соответствующие лунки в двух 384-луночных планшетах. Один набор полученных продуктов RT сначала амплифицировали посредством ПЦР с применением 5'-вырожденного праймера, специфического в отношении лидерной последовательности вариабельной области тяжелой цепи человеческого IgG, и 3'-праймера, специфического в отношении мышиной константной области тяжелой цепи, с образованием ампликона. Затем ампликон снова амплифицировали посредством ПЦР с применением набора 5'-вырожденных праймеров, специфических в отношении каркасной области 1 последовательности вариабельной области тяжелой цепи человеческого IgG, и набора 3'-вырожденных праймеров, специфических в отношении каркасной области 4 последовательности вариабельной области тяжелой цепи человеческого IgG. Другой набор полученных продуктов RT сначала амплифицировали посредством ПЦР с применением 5'-вырожденного праймера, специфического в отношении человеческой лидерной последовательности вариабельной области легкой каппа- или лямбда-цепи, и 3'-праймера, специфического в отношении мышиной константной области легкой каппа- или лямбда-цепи, с образованием ампликона. Затем ампликон снова амплифицировали посредством ПЦР с применением набора 5'-вырожденных праймеров, специфических в отношении каркасной области 1 человеческой последовательности вариабельной области легкой каппа- или лямбда-цепи, и набора

3'-вырожденных праймеров, специфических в отношении каркасной области 4 человеческой последовательности вариабельной области легкой каппа- или лямбда-цепи. Продукты ПЦР тяжелой цепи и легкой цепи клонировали в векторы на основе антитела, содержащие константную область тяжелой цепи человеческого IgG1 и константную область легкой каппа-цепи соответственно. Рекомбинантные антитела человеческого IgG1 получали посредством транзientной трансфекции клеток CHO.

[0214] Первичные скрининги антител, полученных из антителопродуцирующих клеток, тестировали на связывание с клетками. Константы диссоциации связывания между представляющим интерес трансмембранным белком и каждым антителом определяли на Biacore™ T200 (GE Healthcare). Результаты нескольких кампаний в различных условиях показали, что сортировка клеток с применением комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентирующего представляющий интерес трансмембранный белок, была наиболее успешной при идентификации антител, которые связываются с представляющими интерес трансмембранными белками. См. таблицу 1.

Таблица 1

Представляющий интерес трансмембранный белок (антиген)	Платформа	Стратегия презентирования антигена	Иммуноген	Линия мышей	Общее количество антител, которые связывают антиген	% антител, которые связывают антиген
GPCR3	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	Белок	Генетически модифицированная мышь без антигена	118	20,0
GPCR3	Гибридома	Нет данных	Белок	Генетически	156	3,5

				модифицированная мышь без антигена		
GPCR3	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	Модифицированная ДНК	Генетически модифицированная мышь без антигена	63	20,6
GPCR3	Гибридома	Нет данных	Модифицированная ДНК	Генетически модифицированная мышь без антигена	252	6,5
GPCR4	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	Белок	Генетически модифицированная мышь без антигена	313	80,5
GPCR4	Гибридома	Нет данных	Белок	Генетически модифицированная мышь без антигена	89	5,6
GPCR4	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	Модифицированная ДНК	Генетически модифицированная мышь без антигена	213	48,4
GPCR4	Гибридома	Нет данных	Модифицированная ДНК	Генетически модифицированная мышь без антигена	2002	36,1

GPCR5	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	ДНК	Генетически модифицированная мышь без антигена	57	11,6
GPCR5	Гибридома	Нет данных	ДНК	Генетически модифицированная мышь без антигена	315	7,0
GPCR5	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	Белок	Генетически модифицированная мышь без антигена	124	70,5
GPCR5	Гибридома	Нет данных	Белок	Генетически модифицированная мышь без антигена	299	15,4
Ионный канал 2	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	Белок	Генетически модифицированная мышь	70	39,8
Ионный канал 2	Гибридома	Нет данных	Белок	Генетически модифицированная мышь	308	4,3
Ионный канал 2	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	Белок	Генетически модифицированная мышь	92	69,7
Ионный канал 2	Гибридома	Нет данных	Белок	Генетически	43	2,4

				модифицированная мышь		
GPCR6	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	Белок	Генетически модифицированная мышь без антигена	53	18,9
GPCR6	Гибридома	Нет данных	Белок	Генетически модифицированная мышь без антигена	8	1,0
GPCR6	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	Модифицированная ДНК	Генетически модифицированная мышь без антигена	22	9,6
GPCR6	Гибридома	Нет данных	Модифицированная ДНК	Генетически модифицированная мышь без антигена	10	0,6
GPCR1	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	ДНК	Генетически модифицированная мышь без антигена	42	11,9
GPCR1	Гибридома	Нет данных	ДНК	Генетически модифицированная мышь без антигена	82	4,4

Ионный канал 1	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	ДНК	Генетически модифицированная мышь без антигена	156	14,8
Ионный канал 1	Гибридома	Нет данных	ДНК	Генетически модифицированная мышь без антигена	19	0,3
Тетраспанин 1	Сортировка клеток	Комплекс с антигеном	ДНК, белок, комплекс с антигеном	Генетически модифицированная мышь без антигена	81	29
Тетраспанин 1	Гибридома	Нет данных	ДНК, белок, комплекс с антигеном	Генетически модифицированная мышь без антигена	162	8

Пример 3. Обнаружение связывания между представляющим интерес трансмембранным белком, заключенным в комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, и антителом.

[0215] В данном примере нуклеотидную последовательность, кодирующую иллюстративный человеческий трансмембранный белок (GPCR1), модифицировали с прикреплением FLAG-метки и His-метки (10x-His-метки) к карбоксиконцу последовательности белка GPCR1, и обеспечивали экспрессию модифицированной нуклеотидной последовательности в клетках, и очищали таким образом, как изложено в примере 1. Иллюстративный представляющий интерес трансмембранный белок GPCR1 затем встраивали в комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок и комплексы липидный бислой-мембранный

каркасный белок, заключающие в себе представляющий интерес трансмембранный белок GPCR1, очищали таким образом, как описано в примере 1.

[0216] Способность известного антитела к GPCR1 связываться с комплексами липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающими в себе представляющий интерес трансмембранный белок GPCR1, подтверждали посредством октетного анализа, как показано на фиг. 1A и 1B. В частности, 38 мкг/мл комплекса дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок, включающего трансмембранный белок GPCR1, или 10 мкг/мл контрольного комплекса дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок без GPCR1 (пустой комплекс) помещали в планшеты с иммобилизованным антителом к GPCR1 (положительный контроль АВ) или антителом изотипического контроля (отрицательный контроль АВ).

[0217] Обнаруживали связывание между антителом положительного контроля (антителом к GPCR1) и комплексом дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок, включающим трансмембранный белок GPCR1 (0,6 нм), и не обнаруживали связывание между антителом к GPCR1 и пустым комплексом (-0,05 нм), между антителом отрицательного контроля и комплексом дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок, включающим трансмембранный белок GPCR1 (-0,06 нм), или между антителом отрицательного контроля и пустым комплексом (-0,03 нм). См. фиг. 1A. Подтверждение того, что представляющий интерес трансмембранный белок, презентуемый комплексом, но не сам комплекс связывается с антителами, направленными на представляющий интерес трансмембранный белок.

[0218] В целях подтверждения того, что биотинилированные комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующие представляющий интерес трансмембранный белок, могут быть обнаружены и выделены из контрольного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок,

биотинилированный контрольный комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок (пустой комплекс), биотинилированный комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентирующий трансмембранный белок GPCR1 (комплекс с GPCR1), или контрольный комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, контрольный биотинилированный комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок (пустой комплекс) помещали в планшеты, содержащие стрептавидин, связанный с ним, для обеспечения возможности связывания стрептавидаина с меткой Bir-A, прикрепленной к мембранному каркасному белку в комплексе. Затем планшеты инкубировали либо с 50 мкг/мл антитела к GPCR1 (положительного контроля АВ), либо с 50 мкг/мл антитела изотипического контроля (отрицательного контроля АВ). См. фиг. 1В.

[0219] Во-первых, на фиг. 1В продемонстрировано, что биотинилированные комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентирующие представляющий интерес трансмембранный белок GPCR1, и биотинилированные контрольные комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок могут быть обнаружены и выделены путем связывания стрептавидаина с меткой Bir-A, прикрепленной к каждому из мембранных каркасных белков в комплексе. Это показано путем обнаружения связывания между связанным стрептавидином и как биотинилированным комплексом дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок, включающим трансмембранный белок GPCR1 (3,0 нм), так и биотинилированным пустым комплексом (0,69 нм).

[0220] Обнаруживали связывание между антителом положительного контроля (антителом к GPCR1) и биотинилированным комплексом дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок, включающим трансмембранный белок GPCR1, связанный с планшетом со стрептавидином (0,69 нм), но не обнаруживали связывание между антителом к GPCR1 и биотинилированным пустым комплексом (-0,04 нм), между антителом отрицательного контроля и биотинилированным комплексом дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок,

включающим трансмембранный белок (-0,05 нм), или между антителом отрицательного контроля и биотинилированным пустым комплексом (-0,06 нм). См. фиг. 1В, на которой продемонстрировано, что биотинилированные комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, связанные с планшетом со стрептавидином, которые презентуют представляющий интерес трансмембранный белок, специфически связываются с антителом к GPCR1, но не с контрольным антителом.

Пример 4. Получение антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, которое специфически связывает иллюстративный представляющий интерес трансмембранный белок.

[0221] Нуклеотидную последовательность, кодирующую первый, второй и третий иллюстративные человеческие трансмембранные белки, модифицировали с прикреплением FLAG-метки и His-метки (10x-His-метка) к карбоксиконцу трансмембранного белка, и обеспечивали экспрессию модифицированной нуклеотидной последовательности в клетках, и очищали таким образом, как изложено в примере 1. Комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающие в себе либо первый, второй, либо третий иллюстративный представляющий интерес трансмембранный белок, создавали с применением мембранных каркасных белков, меченных с помощью Bir-A, и очищали таким образом, как описано в примерах 1 и 3.

[0222] Собирали спленоциты у генетически модифицированных мышей VELOCIMMUNE®, содержащих гуманизированный локус IgH и/или гуманизированный локус Igk, в которых отсутствует эндогенный мышинный ген, кодирующий представляющий интерес трансмембранный белок. Выделяли клетки у контрольных мышей, которые не были иммунизированы, или у генетически модифицированных мышей, которые были иммунизированы посредством инъекции ДНК, кодирующей первый представляющий интерес трансмембранный белок

(GPCR1), второй представляющий интерес трансмембранный белок (GPCR2) или третий представляющий интерес трансмембранный белок (GPCR3). В данном случае каждую мышь генетически модифицировали. Спленоциты, собранные у каждой мыши, окрашивали флуоресцентными метками к маркерам В-клеток (т. е. антителом к IgG) и в то же время инкубировали с от 0,2 мг/мл до 5,0 мг/мл биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащего встроенный в него трансмембранный белок. Затем клетки промывали для удаления несвязанного комплекса. Впоследствии клетки инкубировали с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки промывали в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) для удаления избыточного PE-стрептавидина. Флуоресценцию PE популяций клеток от контрольных мышей и иммунизированных мышей обнаруживали посредством FACS для идентификации популяции В-клеток, которые экспрессируют антитела, которые связываются с представляющим интерес трансмембранным белком, презентуемым биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок. См. фиг. 2A — 2F.

[0223] Лишь две В-клетки из одного миллиона контрольных клеток неспецифически связывались с трансмембранным белком GPCR1, презентуемым биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок (фиг. 2A, прямоугольник), что демонстрирует, что комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащие представляющий интерес трансмембранный белок, являются высокоспецифическими сортирующим реагентом для обнаружения и выделения клеток, которые продуцируют антитела, направленные к трансмембранному белковому антигену. Для сравнения, с применением настоящих способов обнаруживали 11 из одного миллиона антителопродуцирующих В-клеток, которые связывались с первым представляющим интерес трансмембранным белком, презентуемым

биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок (фиг. 2B, прямоугольник).

[0224] Как показано на фиг. 2C, две В-клетки на один миллион спленоцитов, полученных от контрольной мыши, обнаруживали как клетки, неспецифически связывающиеся с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующим второй представляющий интерес трансмембранный белок (прямоугольник). В отличие от этого, как показано на фиг. 2D, с применением настоящих способов (прямоугольник) обнаруживали семьдесят восемь из одного миллиона В-клеток, экспрессирующих антитело, специфическое в отношении второго иллюстративного представляющего интерес трансмембранного белка GPCR (GPCR2).

[0225] В еще одном примере из одного миллиона спленоцитов, собранных у контрольной мыши, получали только одиннадцать В-клеток, которые неспецифически связывались с биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующим третий представляющий интерес трансмембранный белок (прямоугольник). См. фиг. 2E. Тогда как из спленоцитов, собранных у иммунизированной генетически модифицированной мыши, обнаруживали и получали шестьдесят пять из одного миллиона В-клеток, экспрессирующих первичное антитело, специфическое в отношении третьего иллюстративного представляющего интерес трансмембранного белка GPCR (GPCR3).

Пример 5. Сравнение известных стратегий сортировки клеток со способами сортировки, которые включают применение комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок.

[0226] В целях сравнения полезности способов получения антителопродуцирующих клеток, известных из уровня техники, со способами по настоящему изобретению, раскрытыми в данном документе, ДНК, кодирующую

иллюстративный человеческий представляющий интерес трансмембранный белок, очищали согласно примеру 1. Для иммунизации когорт мышей ДНК, кодирующую представляющий интерес трансмембранный белок, очищенную человеческую ДНК путем инъекции вводили генетически сконструированным мышам VELOCIMMUNE®, которые экспрессируют или не экспрессируют эндогенный мышинный ген, кодирующий представляющий интерес трансмембранный белок. В случае когорт, иммунизированных представляющим интерес трансмембранным белком, обеспечивали экспрессию в клетках нуклеотидной последовательности, кодирующей первый иллюстративный человеческий трансмембранный белок, очищали, как изложено в примере 1, и непосредственно путем инъекции вводили генетически сконструированным мышам VELOCIMMUNE®, которые экспрессируют или не экспрессируют эндогенный мышинный ген, кодирующий представляющий интерес трансмембранный белок.

[0227] В некоторых когортах мышей иммунизировали с помощью VLP. Плазмиду, содержащую ДНК, кодирующую человеческий представляющий интерес трансмембранный белок, создавали и обеспечивали ее экспрессию в зараженных вирусом клетках. Обеспечивали самосборку липочастиц в зараженных вирусом клетках, их выделяли и очищали из зараженных вирусом клеток, как только происходило почкование, путем преципитации пегилированием (PEG) с последующим изопикническим центрифугированием и фракционированием среды зараженных вирусом клеток. Очищенные VLP путем инъекции вводили мышам для иммунизации с применением известных методик.

[0228] Для сравнения, генетически сконструированные мыши VELOCIMMUNE®, содержащие ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина (IgH) и переменные области легкой цепи человеческого иммуноглобулина, с (VI) или без (VI-KO) эндогенного мышинного гена, кодирующего представляющий интерес трансмембранный белок, путем инъекции иммунизировали, как изложено в таблице 2.

[0229] Далее выделяли популяцию антителопродуцирующих В-клеток с применением стратегии сортировки, описанной в таблице 2. В частности, собирали спленоциты у иммунизированных генетически модифицированных мышей. Собранные спленоциты окрашивали флуоресцентными метками к маркерам В-клеток (т. е. антителами к IgG) и в то же время инкубировали с от 0,2 мг/мл до 5,0 мг/мл сортирующего средства, являющегося биотинилированным представляющим интерес трансмембранным белком (белком), или с от 0,2 мг/мл до 5,0 мг/мл биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающего в себе представляющий интерес трансмембранный белок (комплекс с TMB), или с от 2,0 мг/мл до 20 мг/мл сортирующего средства, меченного биотином VLP (VLP), как изложено в таблице 2. Затем клетки промывали для удаления несвязанного сортирующего средства. Впоследствии клетки инкубировали с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Big-A) сортирующих средств. Клетки промывали в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) для удаления избыточного PE-стрептавидина и флуоресценцию PE образцов В-клеток анализировали посредством FACS для идентификации В-клеток в гетерогенной популяции клеток, которые экспрессируют антитела, которые связываются с представляющим интерес трансмембранным белком, презентированным сортирующим средством.

[0230] Отдельные антителопродуцирующие В-клетки, которые связались с представляющим интерес трансмембранным белком, затем выделяли в отдельные лунки в 384-луночных планшетах, как изложено в примере 2. RT-PCR генов антител из таких В-клеток проводили согласно способу, описанному в Wang and Stollar *Journal of Immunological Methods* (2000) 244: 217—225. Вкратце, молекулы кДНК для каждой отдельной В-клетки синтезировали с помощью реакции с обратной транскриптазой (RT) (SuperscriptTM III, Invitrogen). Затем каждый полученный продукт RT разделяли и переносили в две соответствующие лунки в двух 384-

луночных планшетах. Один набор полученных продуктов РТ сначала амплифицировали посредством ПЦР с применением 5'-вырожденного праймера, специфического в отношении лидерной последовательности вариабельной области тяжелой цепи человеческого IgG, и 3'-праймера, специфического в отношении мышиной константной области тяжелой цепи, с образованием ампликона. Затем ампликон снова амплифицировали посредством ПЦР с применением набора 5'-вырожденных праймеров, специфических в отношении каркасной области 1 последовательности вариабельной области тяжелой цепи человеческого IgG, и набора 3'-вырожденных праймеров, специфических в отношении каркасной области 4 последовательности вариабельной области тяжелой цепи человеческого IgG. Другой набор полученных продуктов РТ сначала амплифицировали посредством ПЦР с применением 5'-вырожденного праймера, специфического в отношении человеческой лидерной последовательности вариабельной области легкой каппа- или лямбда-цепи, и 3'-праймера, специфического в отношении мышиной константной области легкой каппа- или лямбда-цепи, с образованием ампликона. Затем ампликон снова амплифицировали посредством ПЦР с применением набора 5'-вырожденных праймеров, специфических в отношении каркасной области 1 человеческой последовательности вариабельной области легкой каппа- или лямбда-цепи, и набора 3'-вырожденных праймеров, специфических в отношении каркасной области 4 человеческой последовательности вариабельной области легкой каппа- или лямбда-цепи. Продукты ПЦР тяжелой цепи и легкой цепи клонировали в векторы на основе антитела, содержащие константную область тяжелой цепи человеческого IgG1 и константную область легкой каппа-цепи соответственно. Рекомбинантные человеческие антитела IgG1 получали посредством транзientной трансфекции клеток СНО К1 и анализировали на их способность связывать представляющий интерес трансмембранный белок.

Таблица 2

Трансмембранный белок (ТМБ)	Линии мышей	Количество мышей	Иммуноген	Сортирующее средство	Общее количество антител, которые связывают ТМБ
GPCR1	VI	9	VLP и ДНК	VLP	Отсутствует
GPCR1	VI	9	Белок	Белок	176
GPCR1	VI-KO	3	ДНК	Комплекс с ТМБ	42
Ионный канал 2	VI-KO	15	Белок	Белок	1
Ионный канал 2	VI-KO	14	Белок	Белок	1
Ионный канал 2	VI-KO	4	Белок	Комплекс с ТМБ	236
Ионный канал 2	VI-KO	4	Белок	Комплекс с ТМБ	167

[0231] В таблице 2 продемонстрировано, что способы получения антителопродуцирующих клеток, в которых используется комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок для презентирования трансмембранного белка, обнаруживают больше антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, которое специфически связывается с представляющим интерес трансмембранным белком, по сравнению с другими сортирующими средствами независимо от применяемого иммуногена.

[0232] Клетки, подвергнутые сортировке с помощью очищенного сортирующего средства, представляющего собой трансмембранный белок, которые получали от генетически модифицированных мышей, которые экспрессируют мышинный эндогенный ген, кодирующий представляющий интерес трансмембранный белок (VI), вырабатывали больше антител, которые связывались с представляющим интерес трансмембранным белком, по сравнению с клетками, полученными от генетически модифицированных мышей, которые не экспрессировали эндогенный мышинный ген, кодирующий представляющий интерес трансмембранный белок (VI-KO), и подвергнутые сортировке с помощью комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, который презентировал трансмембранный белок. Однако, в ходе анализа антитела, полученные от мышей

VI, не представляли собой функциональные связующие молекулы. Демонстрация того, что способы получения антителопродуцирующих клеток, в которых применяют комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок для презентирования трансмембранного белка, позволяют получать антитела, которые связываются с функционально релевантными эпитопами трансмембранного белка.

Пример 6. Создание и выделение антител, которые связывают второй иллюстративный представляющий интерес трансмембранный белок GPCR

[0233] Нуклеотидную последовательность, кодирующую второй иллюстративный представляющий интерес трансмембранный белок GPCR (GPCR2), модифицировали таким образом, как изложено в примере 1, с включением FLAG-метки и 10x-His-метки, прикрепленных к карбоксиконцу белка GPCR2. Кроме того, в трансмембранный белок вводили следующие стабилизирующие мутации: аминокислотные замены: A2a-T4L-дельта, как описано в Veli-Pekka Jaakola et al., *Science*. 2008, Nov 21; 322(5905) pp. 1211—1217, полное содержание которого явным образом включено в данный документ посредством ссылки. Модифицированную нуклеотидную последовательность GPCR2 клонировали в вектор экспрессии и обеспечивали ее экспрессию в клетках Sf9. Затем клетки солибилизовали и получали и очищали модифицированные трансмембранные белки GPCR2, как в примере 1.

[0234] Далее, как изложено в примере 1 и в данном документе, получали комплексы дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащие модифицированный человеческий трансмембранный белок GPCR2.

[0235] Генетически модифицированных мышей с нокаутом по GPCR2, т. е. мышей VELOCIMMUNE®, содержащих гуманизированный локус IgH и гуманизированный локус Igk, у которых также отсутствует эндогенный мышинный ген, кодирующий представляющий интерес трансмембранный белок, иммунизировали путем инъекции экзогенной ДНК, кодирующей

модифицированный человеческий белок GPCR2, содержащий стабилизирующие мутации (ДНК-иммуногена), или инъекции модифицированного человеческого белка GPCR2, содержащего стабилизирующие мутации (белковый иммуноген), как показано в таблице 3.

[0236] Собирали спленциты у каждой мыши и окрашивали флуоресцентными метками к маркерам В-клеток (т. е. антителом к IgG) и в то же время инкубировали с от 0,2 мг/мл до 5,0 мг/мл биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащего встроенный в него трансмембранный белок. Затем клетки промывали для удаления несвязанного комплекса. Впоследствии клетки инкубировали с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки промывали в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) для удаления избыточного PE-стрептавидина. Флуоресценцию PE популяций клеток от контрольных мышей и иммунизированных мышей обнаруживали посредством FACS для идентификации популяции В-клеток, которые экспрессируют антитела, которые связываются со вторым иллюстративным представляющим интерес трансмембранным белком GPCR, презентруемым биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок.

[0237] Отдельные антителопродуцирующие В-клетки, которые связались с представляющим интерес трансмембранным белком, затем выделяли в отдельные лунки в 384-луночных планшетах, ДНК, кодирующую антитело, выделяли из каждой клетки, антитела получали таким образом, как изложено в примере 2, для дальнейшего анализа.

[0238] На фиг. 3 продемонстрировано, что способы по настоящему изобретению для получения антителопродуцирующих клеток позволяют обнаруживать антителопродуцирующие клетки, которые экспрессируют антитело,

которое специфически связывается с представляющим интерес трансмембранным белком, независимо от типа применяемого иммуногена. В частности, антителопродуцирующие клетки получали от генетически сконструированных мышей, иммунизированных либо с помощью ДНК, кодирующей трансмембранный белок (ДНК), либо очищенным представляющим интерес трансмембранным белком (белком) с применением биотинилированного липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующего представляющий интерес трансмембранный белок, согласно раскрытым способам. Получали антитела для скрининга, как изложено в примере 2. Обеспечивали экспрессию антигена, являющегося представляющим интерес полноразмерным трансмембранным белком, в клетках 293 (обеспечивали сверхэкспрессию ТМВ) с применением стандартных методик трансфекции, и клетки 293, экспрессирующие антиген, сравнивали с контрольными клетками 293, которые не были трансфицированы с помощью ДНК, кодирующей иллюстративный представляющий интерес трансмембранный белок (родительские клетки). Затем клетки инкубировали с антителами для обеспечения связывания между антигеном на поверхности клеток и антителом, которое специфически связывает иллюстративный представляющий интерес трансмембранный белок. Иммуноанализ MSD (Meso scale diagnostics) проводили согласно инструкциям производителя для идентификации связывающих клетки антител, полученных из антителопродуцирующих клеток, полученных от 5 отличающихся иммунизированных мышей. Мышей 1, 3, 4 и 5 иммунизировали очищенным человеческим трансмембранным белком GPCR2, в то время как мышь 2 иммунизировали с помощью ДНК, кодирующей человеческий трансмембранный белок GPCR2. Антитела над пунктирной линией были способны связывать представляющий интерес трансмембранный белок. В отличие от этого, антитела под пунктирной линией были слабыми связующими молекулами или неспособными связывать представляющий интерес трансмембранный белок, как показано при

сравнении с антителами положительного (с помощью квадратов) и отрицательного (с помощью треугольников) контроля.

[0239] Из результатов видно, что антителопродуцирующие клетки, полученные с применением способов по настоящему изобретению, продуцировали достаточные количества антител, способных связывать представляющий интерес трансмембранный белок (над пунктирной линией), независимо от того, были ли мыши иммунизированы с помощью ДНК, кодирующей представляющий интерес трансмембранный белок, или представляющим интерес трансмембранным белком.

[0240] Как показано в таблице 3, В-клетки получали от каждой иммунизированной мыши с применением биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, который презентует трансмембранный белок (комплекс с ТМВ), получали антитела из субпопуляции собранных В-клеток и антитела тестировали посредством иммуноанализа на способность связываться с представляющим интерес антигеном. Антителопродуцирующие клетки, которые экспрессируют антитело, которое специфически связывается с представляющим интерес трансмембранным белком (антигеном), с применением способов по настоящему изобретению получали в избытке независимо от того, были ли мыши иммунизированы с помощью ДНК, кодирующей трансмембранный белок, или очищенным трансмембранным белком.

Таблица 3

Мышь	Иммуноген	Сортирующее средство	Количество антителопродуцирующих клеток	Количество протестированных антител	Количество антигенсвязывающих антител	% антител, которые связывают антиген
1	Белок	Комплекс с ТМВ	723	141	59	42

2	ДНК	Комплек с с ТМВ	561	140	88	63
3	Белок	Комплек с с ТМВ	880	141	98	70
4	Белок	Комплек с с ТМВ	1040	141	99	70
5	Белок	Комплек с с ТМВ	640	141	102	72
Всего			3844	704	446	63

Пример 7. Получение антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывает специфический домен представляющего интерес трансмембранного белка.

[0241] Способы по настоящему изобретению также применяли для создания антител, которые специфически связываются с эпитопом, расположенным на конкретном домене представляющего интерес трансмембранного белка.

[0242] В первом случае нуклеотидную последовательность, кодирующую полноразмерный человеческий трансмембранный белок (полноразмерный ТМВ), модифицировали с прикреплением FLAG-метки и His-метки (10x-His-метки) к карбоксиконцу трансмембранного белка, очищали и выделяли таким образом, как изложено в примере 1. Кроме того, нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий усеченный трансмембранный белок, у которого отсутствует внеклеточная часть N-конца (усеченный ТМВ), дополнительно модифицировали с прикреплением FLAG-метки и His-метки (10x-His-метки) к карбоксиконцу трансмембранного белка и обеспечивали экспрессию модифицированной нуклеотидной последовательности в клетках и очищали таким образом, как изложено в примере 1. Комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающие усеченный ТМВ, создавали с применением мембранных каркасных белков, меченных с помощью Bir-A, и очищали таким

образом, как описано в примерах 1 и 3. В данном случае усеченный белок ТМВ содержит каждый из внеклеточных петлевых доменов, трансмембранных доменов и внутриклеточного С-концевого домена человеческого трансмембранного белка дикого типа, но не внеклеточный N-концевой домен. Следовательно, комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающие в себе усеченный ТМВ, презентируют только внеклеточные петлевые домены человеческого трансмембранного белка дикого типа.

[0243] Генетически сконструированных мышей VELOCIMMUNE®, содержащих ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина (IgH) и переменные области легкой цепи человеческого иммуноглобулина, иммунизировали с помощью ДНК, кодирующей полноразмерный ТМВ. Осуществляли мониторинг иммунного ответа и у иммунизированных мышей собирали спленоциты. Спленоциты, собранные у каждой мыши, окрашивали флуоресцентными метками к маркерам В-клеток (т. е. антителом к IgG) и в то же время инкубировали с от 0,2 мг/мл до 5,0 мг/мл биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентирующего усеченный ТМВ, который встроен в него, для обеспечения связывания между эпитопом на внеклеточном домене усеченного ТМВ и антителом на поверхности В-клетки. Затем клетки промывали для удаления несвязанного комплекса. Впоследствии клетки инкубировали с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки промывали в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) для удаления избыточного PE-стрептавидина. Флуоресценцию PE популяций клеток, собранных у мышей, обнаруживали посредством FACS для идентификации популяции В-клеток, которые экспрессируют антитела, специфические в отношении внеклеточного петлевого домена представляющего интерес трансмембранного белка.

[0244] Отдельные антителопродуцирующие В-клетки, которые связались с представляющим интерес трансмембранным белком, затем выделяли в отдельные лунки в 384-луночных планшетах, ДНК, кодирующую антитело, выделяли из каждой клетки, и антитела получали таким образом, как изложено в примере 2, для дальнейшего анализа.

[0245] Как показано на фиг. 4, антитела, которые связывают эпитоп, расположенный во внеклеточном петлевом домене иллюстративного представляющего интерес трансмембранного белка, получали с применением способов по настоящему изобретению (в рамке).

[0246] В другом случае нуклеотидную последовательность, кодирующую полноразмерный человеческий трансмембранный белок (полноразмерный ТМВ), модифицируют с прикреплением FLAG-метки и His-метки (10x-His-метки) к карбоксиконцу трансмембранного белка, очищают и выделяют таким образом, как изложено в примере 1. Кроме того, получают нуклеотидную последовательность, кодирующую часть человеческого трансмембранного белка (фрагмент ТМВ), и обеспечивают экспрессию нуклеотидной последовательности фрагмента ТМВ в клетках и очищают таким образом, как изложено в примере 1. В данном случае полипептид ТМВ фрагмента ТМВ соответствует N-концевой части полноразмерного представляющего интерес трансмембранного белка.

[0247] Комплексы липидный бислои-мембранный каркасный белок, заключающие в себе полноразмерный ТМВ, получают с применением мембранных каркасных белков, меченных с помощью Bir-A, и очищают таким образом, как описано в примерах 1 и 3.

[0248] Генетически модифицированных мышей VELOCIMMUNE®, содержащих ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина (IgH) и переменные области легкой цепи человеческого иммуноглобулина, иммунизируют с помощью ДНК, кодирующей полноразмерный

ТМВ, или очищенным полноразмерным белком ТМВ. Осуществляют мониторинг иммунного ответа и у иммунизированных мышей собирают спленоциты. Спленоциты, собранные у каждой мыши, инкубируют с фрагментом ТМВ для обеспечения связывания между фрагментом ТМВ и антителом на поверхности клеток, которые являются специфическими в отношении эпитопа, расположенного на N-конце полноразмерного ТМВ. Данная стадия обеспечивает эффективную блокировку всех антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, специфическое в отношении эпитопа в N-концевом домене полноразмерного ТМВ, от связывания с полноразмерным ТМВ, презентуемым биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащим встроенный полноразмерный ТМВ. Затем клетки окрашивают флуоресцентными метками к маркерам В-клеток (т. е. антителом к IgG) для идентификации антителопродуцирующих В-клеток в популяции спленоцитов, а также инкубируют с от 0,2 мг/мл до 5,0 мг/мл биотинилированных комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающих в себе полноразмерный ТМВ, для обеспечения связывания между эпитопом на внеклеточном петлевом домене полноразмерного ТМВ и антителом на поверхности антителопродуцирующей В-клетки. Затем клетки промывают для удаления несвязанного комплекса. Клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки промывают в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) с исключением из результатов сортировки избыточного PE-стрептавидина и клеток, связанных с фрагментом ТМВ. Флуоресценцию PE популяций клеток, собранных у мышей, обнаруживают посредством FACS для идентификации популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитела, специфические в отношении внеклеточного петлевого домена представляющего интерес трансмембранного белка.

[0249] Отдельные антителопродуцирующие В-клетки, которые связываются с представляющим интерес трансмембранным белком, затем выделяют в отдельные лунки в 384-луночных планшетах, ДНК, кодирующую антитела, выделяют из каждой клетки и антитела получают таким образом, как изложено в примере 2, для дальнейшего анализа.

[0250] В другом случае применяют представляющий интерес химерный трансмембранный белок, состоящий из части человеческого представляющего интерес трансмембранного белка и части мышинового гомолога представляющего интерес трансмембранного белка, для получения антител, которые специфически связываются с эпитопом, расположенным на конкретном домене представляющего интерес трансмембранного белка.

[0251] В данном случае химерный трансмембранный белок получают путем создания нуклеотидной последовательности, кодирующей часть представляющего интерес человеческого трансмембранного белка, функционально связанного с частью мышинового гомолога представляющего интерес трансмембранного белка, и дополнительной модификации нуклеотидной последовательности с прикреплением FLAG-метки и His-метки (10x-His-метки) к карбоксиконцу химерного трансмембранного белка. Затем нуклеотидную последовательность очищают и выделяют таким образом, как изложено в примере 1. Кроме того, обеспечивают экспрессию в клетках нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный трансмембранный белок, и очищают таким образом, как изложено в примере 1, с получением представляющего интерес меченого химерного трансмембранного белка (химерного ТМВ). В данном случае представляющий интерес химерный трансмембранный белок имеет N-конец, который соответствует мышинному гомологу трансмембранного белка, и внеклеточные петлевые домены, трансмембранные домены и внутриклеточный С-концевой домен, соответствующий представляющему интерес человеческому трансмембранному белку.

[0252] Кроме того, нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий трансмембранный белок дикого типа (человеческий ТМВ), модифицируют с прикреплением FLAG-метки и His-метки (10x-His-метки) к карбоксиконцу трансмембранного белка, очищают и выделяют; затем обеспечивают экспрессию в клетках нуклеотидной последовательности, кодирующей человеческий трансмембранный белок, и очищают его таким образом, как изложено в примере 1.

[0253] Комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающие в себе человеческий ТМВ или химерный ТМВ, получают с применением мембранных каркасных белков, меченных с помощью Bir-A, и очищают таким образом, как описано в примерах 1 и 3.

[0254] Генетически модифицированных мышей VELOCIMMUNE®, содержащих ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина (IgH) и переменные области легкой цепи человеческого иммуноглобулина, иммунизируют с помощью ДНК, кодирующей человеческий ТМВ, или очищенным человеческим белком ТМВ. Осуществляют мониторинг иммунного ответа и у иммунизированных мышей собирают спленоциты. Спленоциты, собранные у каждой мыши, окрашивают флуоресцентными метками к маркерам В-клеток (т. е. антителом к IgG) и в то же время инкубируют с биотинилированными комплексами липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающими в себе химерный ТМВ, для обеспечения связывания между эпитопом на человеческой части химерного ТМВ, презентруемого комплексом, и антителом на поверхности В-клетки. Затем клетки промывают для удаления несвязанного комплекса.

[0255] Клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный

каркасный белок. Затем клетки промывают в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) с исключением из результатов сортировки избыточного PE-стрептавидина и клеток, связанных с фрагментом ТМВ. Флуоресценцию PE популяций клеток, собранных у мышей, обнаруживают посредством FACS для идентификации популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитела, специфические в отношении внеклеточного петлевого домена представляющего интерес трансмембранного белка.

[0256] Данная стратегия иммунизации и сортировки позволяет эффективно удалить все антителопродуцирующие В-клетки, которые экспрессируют антитела, специфические в отношении эпитопа человеческого ТМВ, расположенного на мышинной части химерного ТМВ.

[0257] В другой стратегии иммунизации и сортировки генетически модифицированных мышей VELOCIMMUNE®, содержащих ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина (IgH) и переменные области легкой цепи человеческого иммуноглобулина, иммунизируют с помощью ДНК, кодирующей химерный ТМВ, или очищенным химерным белком ТМВ. Осуществляют мониторинг иммунного ответа и у иммунизированных мышей собирают спленоциты. Спленоциты, собранные у каждой мыши, окрашивают флуоресцентными метками к маркерам В-клеток (т. е. антителом к IgG) и в то же время инкубируют с биотинилированными комплексами липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающими в себе человеческий ТМВ, для обеспечения связывания между эпитопом, расположенным на внеклеточной части человеческого ТМВ, презентруемого комплексом, и антителом на поверхности В-клетки. Затем клетки промывают для удаления несвязанного комплекса.

[0258] Клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A)

мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки промывают в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) с исключением из результатов сортировки избыточного PE-стрептавидина. Флуоресценцию PE популяций клеток, собранных у мышей, обнаруживают посредством FACS для идентификации популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитела, специфические в отношении внеклеточного петлевого домена представляющего интерес человеческого трансмембранного белка.

[0259] Данная конкретная стратегия иммунизации и сортировки также позволяет эффективно удалить все антителопродуцирующие В-клетки, которые экспрессируют антитела, специфические в отношении эпитопа, расположенного на мышинной части химерного ТМВ.

[0260] Отдельные антителопродуцирующие В-клетки, которые связываются с представляющим интерес трансмембранным белком, презентруемым комплексом, затем можно выделить в отдельных лунках в 384-луночных планшетах и из каждой клетки выделить ДНК, кодирующую антитело, для получения и анализа антитела согласно примеру 2.

Пример 8. Получение антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют перекрестно-реагирующее антитело, специфическое в отношении представляющего интерес трансмембранного белка.

[0261] Способы по настоящему изобретению также применяли для создания антител, которые распознают как мышиную, так и человеческую формы иллюстративного представляющего интерес трансмембранного белка.

[0262] Нуклеиновые кислоты, кодирующие два отличающихся иллюстративных человеческих трансмембранных белка, человеческий ТМВ1 и человеческий ТМВ2, модифицировали с прикреплением FLAG-метки и His-метки (10x-His-метки) к карбоксиконцу каждой аминокислотной последовательности

человеческого трансмембранного белка, очищали таким образом, как изложено в примере 1. Кроме того, нуклеиновые кислоты, кодирующие мышинный гомолог каждого из двух трансмембранных белков человека, мышинный TMB1 и мышинный TMB2, модифицировали с прикреплением FLAG-метки и His-метки (10x-His-метки) к карбоксиконцу каждой аминокислотной последовательности мышинового трансмембранного белка и модифицированную нуклеотидную последовательность очищали таким образом, как изложено в примере 1. Далее обеспечивали экспрессию в клетках нуклеиновой кислоты, кодирующей человеческий TMB1, человеческий TMB2, мышинный TMB1 и мышинный TMB2 соответственно, и каждый белок выделяли и очищали таким образом, как изложено в примере 1. Комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающие в себе один из человеческого белка TMB1, человеческого белка TMB2, мышинового белка TMB1 и мышинового белка TMB2, создавали с применением мембранных каркасных белков, меченных с помощью Bir-A, и очищали таким образом, как описано в примере 1.

[0263] Генетически сконструированных мышей VELOCIMMUNE®, содержащих ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина (IgH) и переменные области легкой цепи человеческого иммуноглобулина, которые не экспрессируют эндогенный мышинный гомолог представляющего интерес трансмембранного белка (т. е. мышинный TMB1 или мышинный TMB2), иммунизировали путем инъекции экзогенной ДНК, кодирующей мышинный или человеческий трансмембранный белок, или комбинации экзогенной ДНК, кодирующей человеческий белок TMB1 и мышинный белок TMB2, как изложено в таблице 4.

[0264] Осуществляли мониторинг иммунного ответа и у иммунизированных мышей собирали спленциты. Спленциты, собранные у каждой мыши, окрашивали флуоресцентными метками к маркерам В-клеток (т. е. антителом к IgG) и в то же время инкубировали с биотинилированными комплексами липидный бислой-мембранный каркасный белок, включающими либо конкретный человеческий белок

ТМВ (комплекс с человеческим ТМВ), либо конкретный мышинный белок ТМВ (комплекс с мышинным ТМВ), для обеспечения связывания между представляющим интерес трансмембранным белком, презентуемым биотинилированными комплексами липидный бислой-мембранный каркасный белок, и антителом на поверхности В-клетки. Затем клетки промывали для удаления несвязанного комплекса и инкубировали с РЕ-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченного биотином (Bir-A) комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки промывали в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) с исключением из результатов сортировки избыточного РЕ-стрептавидина. Флуоресценцию РЕ популяций клеток, собранных у мышей, обнаруживали посредством FACS для идентификации популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитела, специфические в отношении представляющего интерес трансмембранного белка.

[0265] Отдельные антителопродуцирующие В-клетки, которые связались с представляющим интерес трансмембранным белком, затем выделяли в отдельные лунки в 384-луночных планшетах, ДНК, кодирующую антитело, выделяли из каждой клетки, и антитела получали таким образом, как изложено в примере 2, для дальнейшего анализа.

[0266] Как показано в таблице 4, иммунизация генетически модифицированных мышей с помощью ДНК, кодирующей только мышинный ТМВ1, и сортировка антителопродуцирующих В-клеток с помощью комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующего человеческий белок ТМВ1, позволяли идентифицировать антителопродуцирующие В-клетки, которые экспрессируют перекрестно-реагирующее антитело, способное связывать мышинный белок ТМВ1 и человеческий белок ТМВ1.

[0267] Кроме того, иммунизация генетически модифицированных мышей с помощью ДНК, кодирующей мышинный белок ТМВ1, вместе с ДНК, кодирующей

человеческий белок TMB1, и сортировка антителопродуцирующих В-клеток, с помощью либо комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующего человеческий белок TMB1, либо комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующего мышинный белок TMB1, позволяли идентифицировать антителопродуцирующие В-клетки, которые экспрессируют перекрестно-реагирующее антитело, способное связывать мышинный белок TMB1 и человеческий белок TMB1.

[0268] В таблице 4 также показано, что иммунизация генетически модифицированных мышей с помощью ДНК, кодирующей только мышинный TMB2, и сортировка антителопродуцирующих В-клеток с помощью комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующего человеческий белок TMB2, или сортировка антителопродуцирующих В-клеток с помощью комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующего мышинный белок TMB2, позволяли идентифицировать антителопродуцирующие В-клетки, которые экспрессируют перекрестно-реагирующие антитела, способные связывать мышинный белок TMB2 и человеческий белок TMB2. Иммунизация генетически модифицированных мышей с помощью ДНК, кодирующей только человеческий TMB2, и сортировка антителопродуцирующих В-клеток с помощью комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующего человеческий белок TMB2, или сортировка антителопродуцирующих В-клеток с помощью комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующего мышинный белок TMB2, также позволяли идентифицировать антителопродуцирующие В-клетки, которые экспрессируют перекрестно-реагирующие антитела, способные связывать мышинный белок TMB1 и человеческий белок TMB1.

Таблица 4

Мышь	Иммуноген	Стратегия презентирования антигена	Количество антителопродуцирующих клеток	Количество протестированных антител	Количество антигенсвязывающих антител	% антител, которые связывают антиген
VI-KO	ДНК мышиног о TMB1	Комплекс с человеческим TMB1	240	131	15	11
VI-KO	ДНК мышиног о TMB1 и ДНК человеческого TMB1	Комплекс с мышинным TMB1	97	66	3	5
VI-KO	ДНК мышиног о TMB1 и ДНК человеческого TMB1	Комплекс с человеческим TMB1	111	66	3	5
VI-KO	ДНК мышиног о TMB2	Комплекс с человеческим TMB2	257	146	42	29
VI-KO	ДНК мышиног о TMB2	Комплекс с мышинным TMB2	624	166	4	2
VI-KO	ДНК человеческого TMB2	Комплекс с человеческим TMB2	736	213	77	36

VI- КО	ДНК человеческого ТМВ2	Комплекс с мышинным ТМВ2	309	125	25	20
-----------	------------------------------	--------------------------------	-----	-----	----	----

Пример 9. Получение антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитела, специфические в отношении представляющего интерес трансмембранного белка, у мышей, иммунизированных комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащим трансмембранный белок.

[0269] В целях определения того, можно ли применять комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающий в себе представляющий интерес трансмембранный белок, в качестве иммуногена для получения антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, специфическое в отношении представляющего интерес трансмембранного белка, нуклеотидную последовательность, кодирующую иллюстративный человеческий трансмембранный белок, человеческий ТМВ2, содержащие FLAG-метку и His-метку (10x-His-метку), прикрепленную к их карбоксиконцу, создавали и очищали таким образом, как изложено в примере 8. Обеспечивали экспрессию в клетках нуклеотидной последовательности, кодирующей модифицированный человеческий белок ТМВ2 и модифицированный белок ТМВ2, их выделяли и очищали таким образом, как изложено в примере 8. Комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающие в себе человеческий белок ТМВ2, создавали с применением мембранных каркасных белков, меченных с помощью Bir-A, и очищали таким образом, как описано в примере 8.

[0270] Кроме того, создавали нуклеотидную последовательность, кодирующую His-метку, и нуклеотидную последовательность, кодирующую FLAG-метку, прикрепленную к модифицированному человеческому белку ТМВ2, обеспечивали их отдельную экспрессию в клетках и очищали таким образом, как изложено в примере 1, с получением FLAG-пептида и HIS-пептида соответственно.

Далее создавали нуклеотидную последовательность, кодирующую мембранный каркасный белок, включенный в комплексы липидный бислой-мембранный каркасный белок, обеспечивали ее отдельную экспрессию в клетках и очищали таким образом, как изложено в примере 1, с получением MSP-пептида.

[0271] Как продемонстрировано в таблице 5, генетически модифицированных мышей VELOCIMMUNE®, содержащих ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина (IgH) и вариабельные области легкой цепи человеческого иммуноглобулина, которые не экспрессируют эндогенный мышинный гомолог представляющего интерес трансмембранного белка (т. е. мышинный TMB2), иммунизировали путем инъекции 0,54 мг/мл комплексов липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающих в себе человеческий белок TMB2 (комплекс с человеческим TMB2). Осуществляли мониторинг иммунного ответа и у иммунизированных мышей собирали спленоциты. Спленоциты, собранные у каждой иммунизированной мыши, окрашивали флуоресцентными метками к маркерам В-клеток (т. е. антителом к IgG) и в то же время инкубировали с MSP-пептидом, FLAG-пептидом и HIS-пептидом для обеспечения связывания между MSP-пептидом, FLAG-пептидом и HIS-пептидом и антителом на поверхности В-клеток, которые являются специфическими в отношении эпитопа, расположенного на MSP-пептиде, FLAG-пептиде и HIS-пептиде соответственно. Данная стадия эффективно блокирует все антителопродуцирующие В-клетки, которые экспрессируют антитела, специфическое в отношении элементов комплекса, отличных от человеческого белка TMB2, презентруемого комплексом.

[0272] Впоследствии оставшиеся В-клетки инкубировали с биотинилированными комплексами липидный бислой-мембранный каркасный белок, включающими либо человеческий белок TMB2 (комплекс с человеческим TMB2), либо мышинный белок TMB2 (комплекс с мышинным TMB2) для обеспечения связывания между представляющим интерес трансмембранным белком,

презентируемым биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, и антителом на поверхности В-клетки. Затем клетки промывали для удаления несвязанного комплекса и инкубировали с РЕ-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки промывали в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) с исключением из результатов сортировки избыточного РЕ-стрептавидина. Флуоресценцию РЕ популяций клеток, собранных у мышей, обнаруживали посредством FACS для идентификации популяции антителопродуцирующих В-клеток, которые экспрессируют антитела, специфические в отношении представляющего интерес трансмембранного белка.

[0273] Отдельные антителопродуцирующие В-клетки, которые связались с представляющим интерес трансмембранным белком, затем выделяли в отдельные лунки в 384-луночных планшетах, ДНК, кодирующую антитело, выделяли из каждой клетки, и антитела получали таким образом, как изложено в примере 2, для дальнейшего анализа.

[0274] Как показано в таблице 5, иммунизация генетически модифицированных мышей комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающим в себе человеческий белок TMB2, и сортировка антителопродуцирующих В-клеток комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, презентующим человеческий белок TMB2, позволяли идентифицировать антителопродуцирующие В-клетки, которые экспрессируют перекрестно-реагирующее антитело, способное связывать гомологи мышинового TMB2 и человеческого белка TMB2, а также антитело, специфическое в отношении человеческого белка TMB2. Кроме того, иммунизация генетически модифицированных мышей комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, заключающим в себе человеческий белок TMB2, и сортировка антителопродуцирующих В-клеток комплексом липидный бислой-мембранный

каркасный белок, презентующим мышиный белок TMB2, позволяли идентифицировать антителопродуцирующие В-клетки, которые экспрессируют только перекрестно-реагирующее антитело, способное связывать мышиный белок TMB2 и человеческий белок TMB2.

Таблица 5

Мышь	Иммуноген	Стратегия презентирования антигена	Общее количество собранных антителопродуцирующих клеток	Количество проанализированных антителопродуцирующих клеток	Количество протестированных антител	Количество антигенсвязывающих антител	% антител, которые связывают антиген
VI-KO	Комплекс с человеческим TMB2	Комплекс с человеческим TMB2	1370	666	116	32	28
VI-KO	Комплекс с человеческим TMB2	Комплекс с мышиным TMB2	102	102	78	10	13

Пример 10. Создание антителопродуцирующих клеток, которые экспрессируют антитело, которое связывается с иллюстративным представляющим интерес трансмембранным белком SLC, и получение из клеток антител, специфических в отношении белка SLC.

[0275] Нуклеотидную последовательность, кодирующую первый иллюстративный представляющий интерес трансмембранный белок SLC,

модифицируют таким образом, как изложено в примере 1, с включением FLAG-метки и 10x-His-метки, прикрепленных к N-концу иллюстративного белка SLC. Нуклеотидную последовательность, кодирующую модифицированный трансмембранный белок SLC, клонируют в вектор экспрессии и обеспечивают ее экспрессию в клетках Sf9. Затем клетки солибилизируют, и получают, и очищают модифицированные трансмембранные белки SLC таким образом, как описано в примере 1.

[0276] Далее, как указано в примере 1 и в данном документе, создают комплексы дискоидальный липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащие модифицированный человеческий трансмембранный белок SLC.

[0277] Генетически модифицированных мышей с нокаутом по SLC, т. е. мышей VELOCIMMUNE®, содержащих гуманизированный локус IgH и гуманизированный локус Igk, у которых также отсутствует эндогенный мышинный ген, кодирующий представляющий интерес трансмембранный белок SLC, иммунизируют путем инъекции экзогенной ДНК, кодирующей модифицированный человеческий белок SLC, и инъекции модифицированного человеческого белка SLC таким образом, как описано в примере 1.

[0278] Собирают спленоциты у каждой иммунизированной мыши и окрашивают флуоресцентными метками к маркерам В-клеток (т. е. антителом к IgG) и в то же время инкубируют с от 0,2 мг/мл до 5,0 мг/мл биотинилированного комплекса липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащего встроенный в него трансмембранный белок SLC. Затем клетки промывают для удаления несвязанного комплекса. Впоследствии клетки инкубируют с PE-стрептавидином для обеспечения возможности связывания стрептавидина с каждым из меченных биотином (Bir-A) мембранных каркасных белков в комплексе липидный бислой-мембранный каркасный белок. Затем клетки промывают в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) для удаления избыточного PE-

стрептавидина. Флуоресценцию PE популяций клеток от контрольных мышей и иммунизированных мышей обнаруживают посредством FACS для идентификации популяции В-клеток, которые экспрессируют антитела, которые связываются с иллюстративным представляющим интерес трансмембранным белком SLC, презентруемым биотинилированным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок.

[0279] Отдельные антителопродуцирующие В-клетки, которые связались с представляющим интерес трансмембранным белком SLC, затем выделяют в отдельные лунки в 384-луночных планшетах, ДНК, кодирующую антитела, выделяют из каждой клетки и антитела получают таким образом, как изложено в примере 2, для дальнейшего анализа.

[0280] Хотя в данном документе были описаны и изображены несколько аспектов настоящего изобретения, специалисты в данной области техники могут повлиять на альтернативные аспекты для достижения тех же целей. Соответственно, прилагаемая формула изобретения предназначена для охвата всех таких альтернативных аспектов, которые соответствуют истинной сути и объему настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения антителопродуцирующей клетки, которая экспрессирует антитело, которое связывается с представляющим интерес трансмембранным белком, при этом способ включает:

(a) приведение популяции антителопродуцирующих клеток в контакт с комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащим представляющий интерес трансмембранный белок, для того, чтобы обеспечить связывание представляющего интерес трансмембранного белка с антителом на клеточной поверхности, и

(b) сбор клеток, связанных с представляющим интерес трансмембранным белком.

2. Способ по п. 1, где комплекс содержит множество липидов, которые образуют дискоидальный фосфолипидный бислой, окруженный по меньшей мере одним мембранным каркасным белком.

3. Способ по п. 1, где популяцию антителопродуцирующих клеток получают из селезенки, лимфатического узла, периферической крови, костного мозга или их комбинации.

4. Способ по п. 1, где популяция антителопродуцирующих клеток содержит клетки периферической крови, В-клетки, плазматические клетки, плазматические клетки видов миеломы или их комбинацию.

5. Способ по п. 4, где популяция антителопродуцирующих клеток содержит В-клетки.

6. Способ по п. 1, где антителопродуцирующие клетки получают от млекопитающего, предварительно иммунизированного представляющим интерес трансмембранным белком.

7. Способ по п. 6, где млекопитающее представляет собой отличное от человека млекопитающее, иммунизированное нуклеиновой кислотой, кодирующей по меньшей мере часть представляющего интерес трансмембранного белка, или по меньшей мере частью представляющего интерес трансмембранного белка.

8. Способ по п. 7, где отличное от человека млекопитающее является генетически сконструированным.

9. Способ по п. 8, где генетически сконструированное отличное от человека млекопитающее не экспрессирует представляющий интерес трансмембранный белок с эндогенного гена.

10. Способ по п. 8, где генетически сконструированное отличное от человека млекопитающее содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческую переменную область тяжелой цепи, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческую переменную область легкой цепи.

11. Способ по п. 8, где генетически сконструированное отличное от человека млекопитающее представляет собой мышь.

12. Способ по п. 9, где указанный представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой человеческий трансмембранный белок.

13. Способ по п. 12, где генетически сконструированное отличное от человека млекопитающее иммунизировано отличным от человеческого гомологом трансмембранного белка или нуклеиновой кислотой, кодирующей отличный от человеческого гомолог трансмембранного белка.

14. Способ по п. 13, где клетки, собранные на стадии (b), экспрессируют антитело, которое связывается с человеческим трансмембранным белком и отличным от человеческого гомологом трансмембранного белка.

15. Способ по п. 12, где генетически сконструированное отличное от человека млекопитающее иммунизировано представляющим интерес химерным трансмембранным белком или нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес химерный трансмембранный белок, и где химерный трансмембранный белок содержит часть отличного от человеческого гомолога представляющего интерес трансмембранного белка и часть человеческого трансмембранного белка.

16. Способ по п. 15, где клетки, собранные на стадии (b), экспрессируют антитело, которое связывается с эпитопом, расположенным на человеческом трансмембранном белке.

17. Способ по п. 8, где представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой химерный трансмембранный белок, где химерный белок содержит часть человеческого трансмембранного белка, функционально связанную с частью отличного от человеческого трансмембранного белка.

18. Способ по п. 17, где генетически сконструированное отличное от человека млекопитающее иммунизировали человеческим трансмембранным белком или нуклеиновой кислотой, кодирующей человеческий трансмембранный белок.

19. Способ по п. 18, где клетки, собранные на стадии (b), экспрессируют антитело, которое связывается с человеческой частью химерного трансмембранного белка.

20. Способ по п. 8, где генетически сконструированное отличное от человека млекопитающее иммунизировано усеченной формой трансмембранного белка.

21. Способ по п. 20, где генетически сконструированное отличное от человека млекопитающее иммунизировано полноразмерной формой трансмембранного белка или нуклеиновой кислотой, кодирующей ее.

22. Способ по п. 20, где усеченная форма трансмембранного белка не содержит N-концевой домен или C-концевой домен полноразмерной формы трансмембранного белка.

23. Способ по п. 22, где усеченная форма трансмембранного белка содержит внеклеточную петлю, и при этом клетки, собранные на стадии (b), экспрессируют антитело, которое связывается с эпитопом, расположенным на внеклеточной петле усеченной формы трансмембранного белка.

24. Способ по п. 1, где стадия (a) дополнительно включает приведение популяции антителопродуцирующих клеток в контакт с по меньшей мере одним блокирующим средством.

25. Способ по п. 24, где по меньшей мере одно блокирующее средство представляет собой полипептид, который связывается с частью представляющего интерес трансмембранного белка.

26. Способ по п. 25, где полипептид связывается с N-концевым доменом представляющего интерес трансмембранного белка или C-концевым доменом представляющего интерес трансмембранного белка.

27. Способ по п. 26, где трансмембранный белок содержит внеклеточную петлю, и при этом клетки, собранные на стадии (b), экспрессируют антитело, которое связывается с эпитопом, расположенным на внеклеточной петле представляющего интерес трансмембранного белка.

28. Способ по п. 24, где популяцию антителопродуцирующих клеток получают от млекопитающего, иммунизированного указанным комплексом липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащим представляющий интерес трансмембранный белок, где комплекс дополнительно содержит первую обнаруживаемую метку, и где представляющий интерес трансмембранный белок содержит вторую обнаруживаемую метку.

29. Способ по п. 28, где по меньшей мере одно блокирующее средство предусматривает (i) первое блокирующее средство, которое связывается с указанной первой обнаруживаемой меткой, и (ii) второе блокирующее средство, которое связывается с указанной второй обнаруживаемой меткой.

30. Способ по п. 29, где по меньшей мере одно блокирующее средство предусматривает третье блокирующее средство, которое связывается с мембранным каркасным белком.

31. Способ по п. 1, где представляющий интерес трансмембранный белок выбран из группы, состоящей из рецептора, связанного с G-белком (GPCR), белка тетраспанина и белка ионного канала.

32. Способ по п. 31, где представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок GPCR.

33. Способ по п. 31, где представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок ионного канала.

34. Способ по п. 31, где представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок тетраспанин.

35. Способ по п. 1, где комплекс дополнительно содержит по меньшей мере один мембранный каркасный белок, который конъюгирован с обнаруживаемой меткой.

36. Способ по п. 35, где сбор клеток, связанных с представляющим интерес трансмембранным белком, включает

обнаружение связывания клеток с представляющим интерес трансмембранным белком;

отделение клеток, связанных с представляющим интерес трансмембранным белком, от клеток, которые не связаны с представляющим интерес трансмембранным белком, и

сбор связанных клеток.

37. Способ по п. 36, где обнаруживаемая метка представляет собой биотин.

38. Способ по п. 37, где указанное обнаружение включает

инкубирование клеток из стадии (b) со стрептавидином-фикоэритрином (PE-стрептавидином), и

идентификацию связанных клеток с применением сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

39. Способ по п. 36, где обнаруживаемая метка представляет собой флуоресцентную молекулу.

40. Способ по п. 39, где указанное обнаружение включает идентификацию связанных клеток с применением FACS.

41. Способ по п. 1, дополнительно включающий (i) выделение из клетки, собранной на стадии (b), нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела, экспрессируемого клеткой, и нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, экспрессируемого клеткой.

42. Способ по п. 41, где способ дополнительно включает после стадии (i):

(ii) трансфекцию клетки-хозяина для введения нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, и нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, выделенную на стадии (i), и

(iii) культивирование клетки-хозяина из стадии (ii) в условиях, при которых экспрессируется антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи.

43. Способ по п. 42, где клетку-хозяина на стадии (ii) трансфицируют первым вектором экспрессии, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, и вторым вектором экспрессии, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи.

44. Способ по п. 42, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

45. Способ по п. 44, где клетка млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомячка (СНО).

46. Антитело, полученное посредством способа по любому из пп. 41—45.

47. Антитело по п. 46, где антитело связывается с представляющим интерес трансмембранным белком, выбранным из группы, состоящей из белка рецептора, связанного с G-белком (GPCR), белка тетраспанина и белка ионного канала.

48. Антитело по п. 47, где представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок GPCR.

49. Антитело по п. 47, где представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок ионного канала.

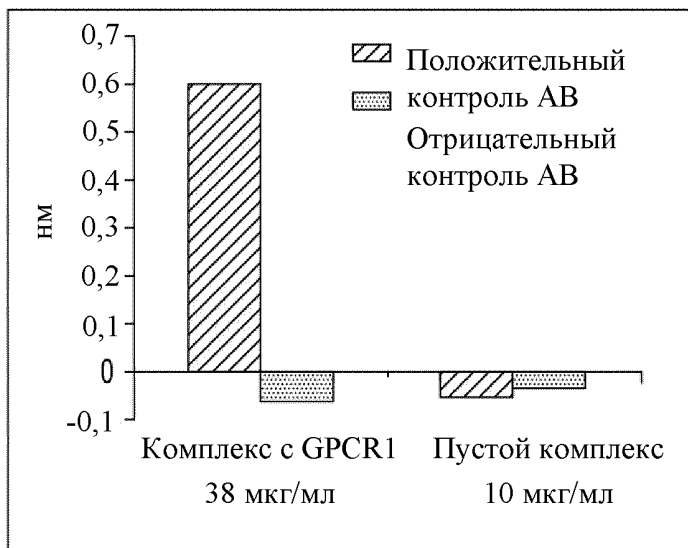
50. Антитело по п. 47, где представляющий интерес трансмембранный белок представляет собой белок тетраспанин.

51. Антитело по п. 46, где антитело модулирует функцию представляющего интерес трансмембранного белка в клетке.

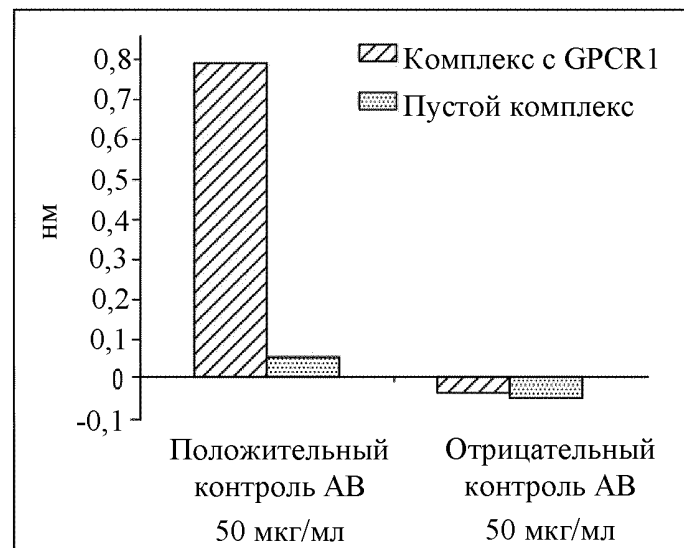
52. Клетка-хозяин млекопитающего, полученная посредством способа по любому из пп. 1—45, где клетка-хозяин экспрессирует антитело или его фрагмент, которые связываются с представляющим интерес трансмембранным белком.

53. Клетка-хозяин млекопитающего по п. 52, где клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (СНО).

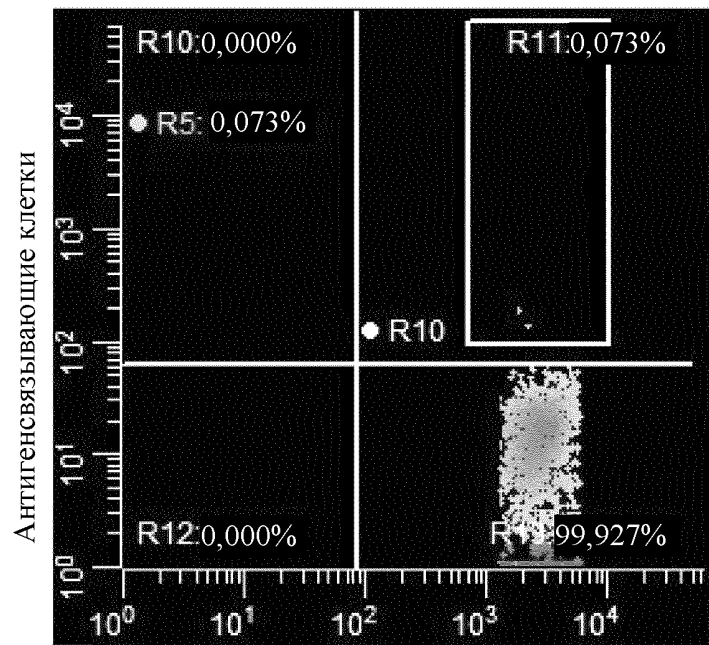
54. Способ по любому из пп. 1—45, где комплекс липидный бислой-мембранный каркасный белок, содержащий представляющий интерес трансмембранный белок, образован путем смешивания липидов, мембранного каркасного белка и представляющего интерес трансмембранного белка в присутствии одного или более детергентов и удаления одного или более детергентов для индуцирования образования комплекса, содержащего представляющий интерес трансмембранный белок.



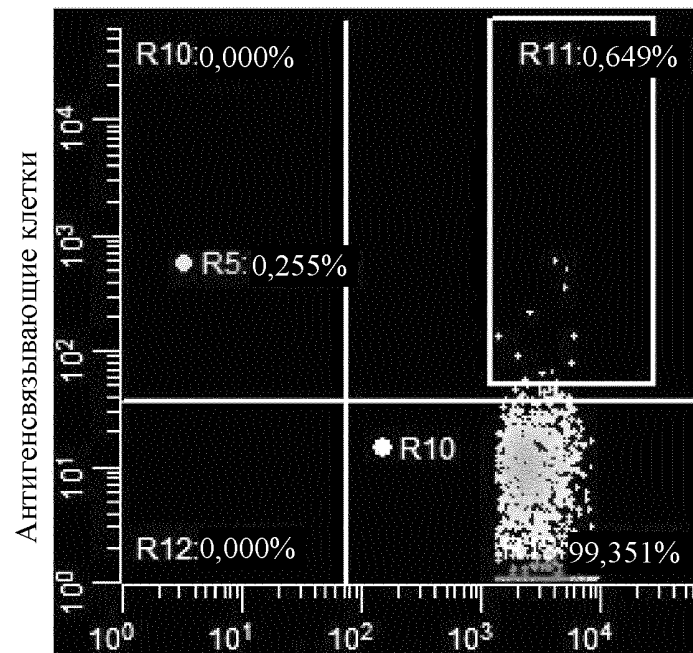
Фиг. 1А



Фиг. 1В

A

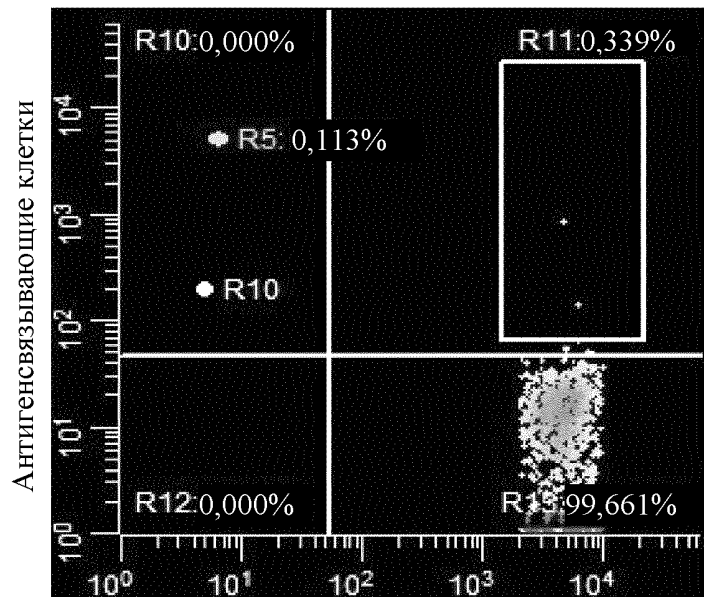
Клетки, положительные в отношении поверхностных IgG

B

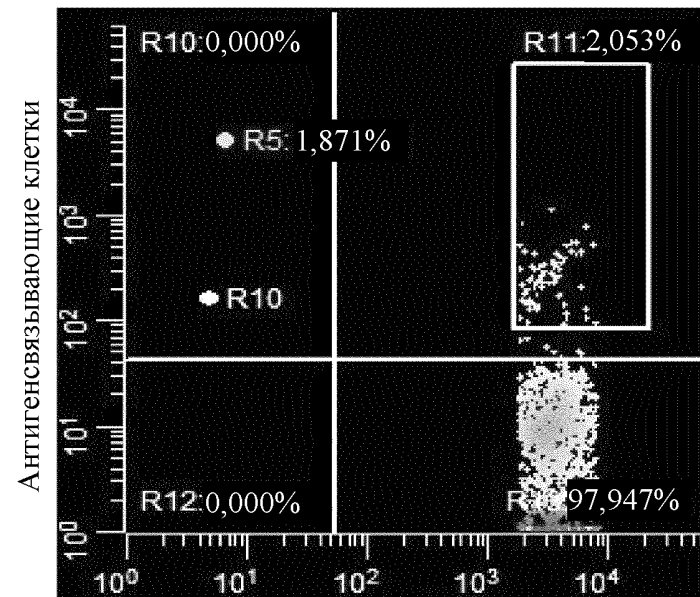
Клетки, положительные в отношении поверхностных IgG

Фиг. 2А — 2В

C

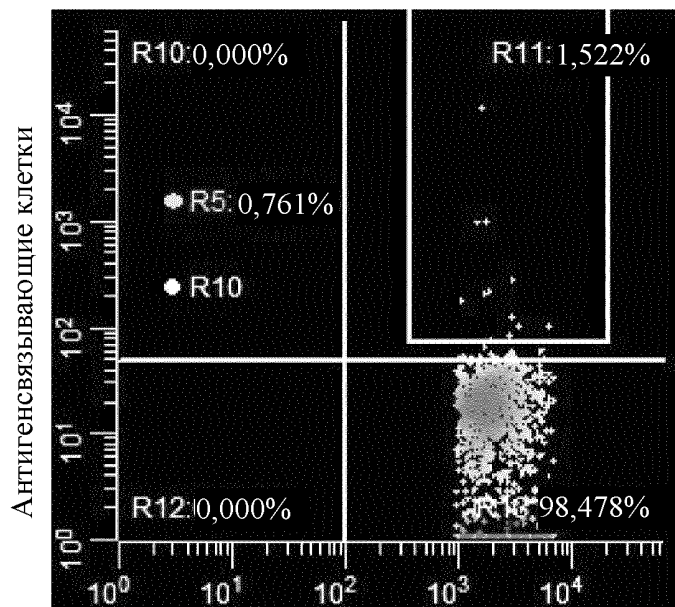


D

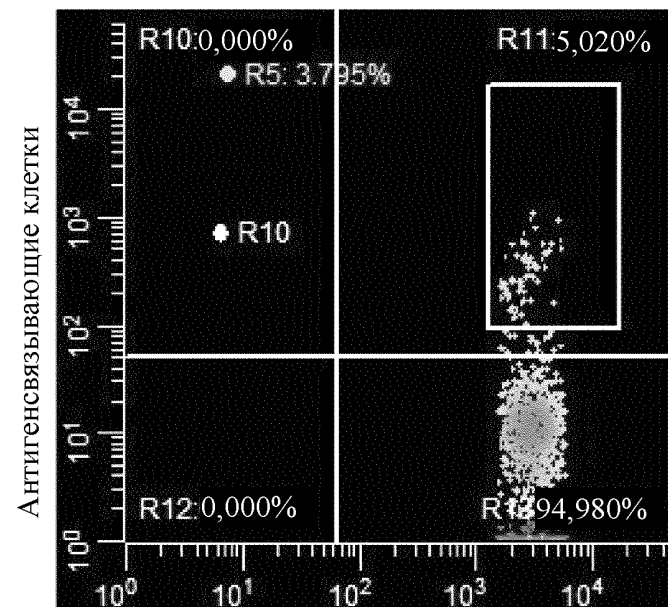


Клетки, положительные в отношении поверхностных IgG Клетки, положительные в отношении поверхностных IgG

Фиг. 2C — 2D

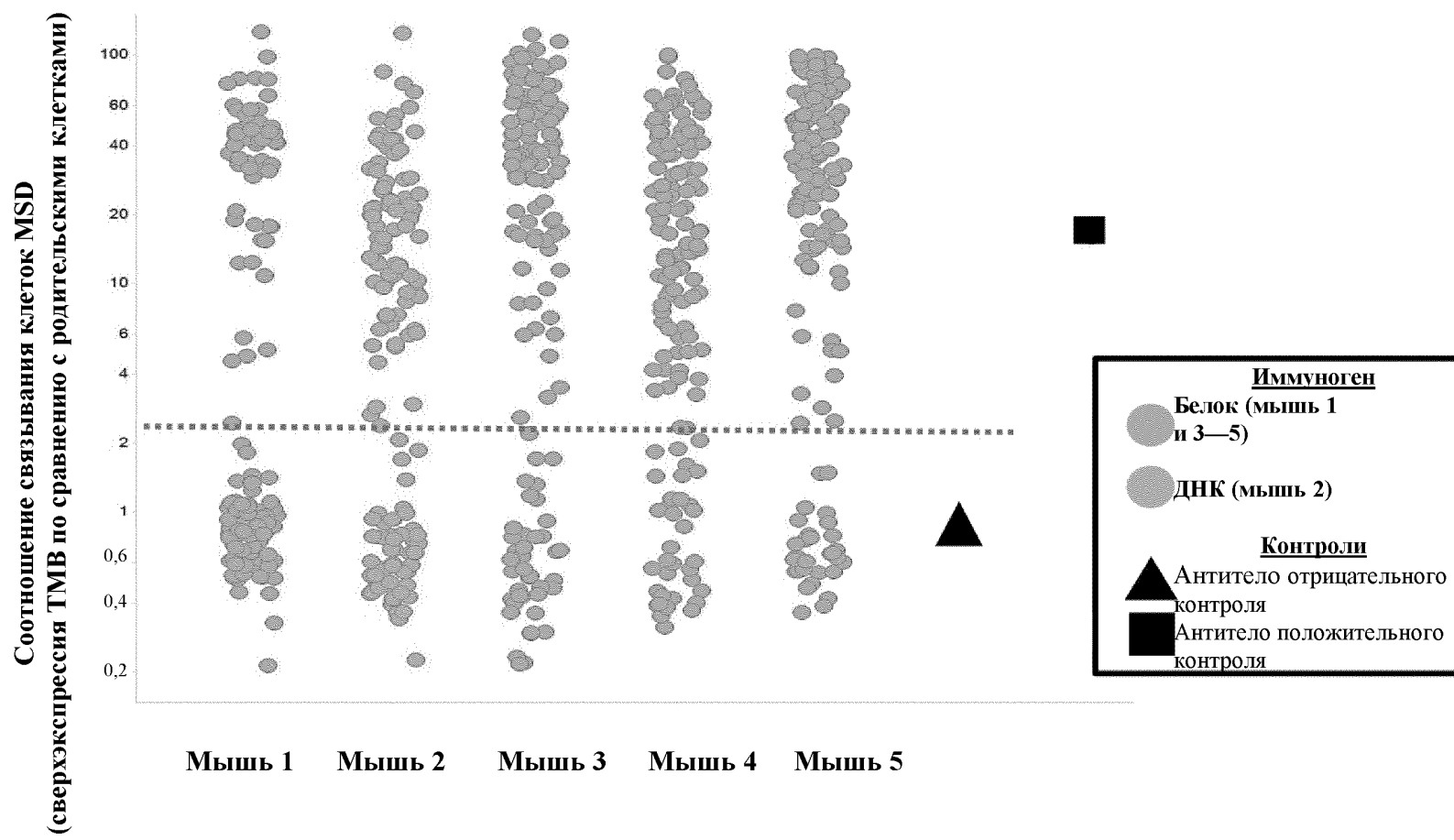
E

Клетки, положительные в отношении поверхностных IgG

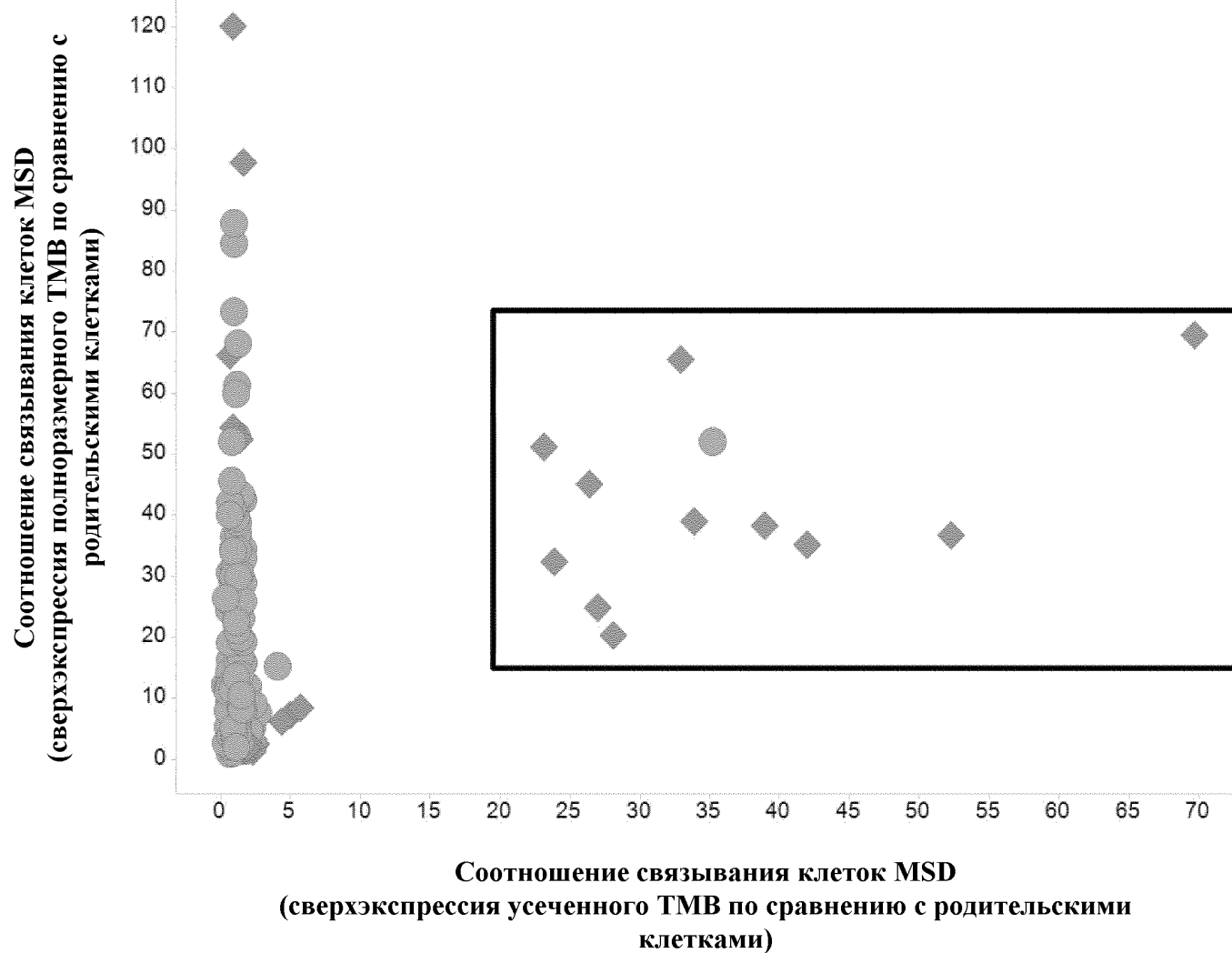
F

Клетки, положительные в отношении поверхностных IgG

Фиг. 2E — 2F



Фиг. 3



Фиг. 4