

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392194** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.12.14

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.25

(54) **ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ iRhom2**

(31) **21160030.9; 21165682.2**

(32) **2021.03.01; 2021.03.29**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/054853**

(87) **WO 2022/184594 2022.09.09**

(71) Заявитель:

**СКИРХОМ (DE); НЬЮ-ЙОРК
СОСАЙЕТИ ФО ЗЕ РИЛИФ
ОФ ЗЕ РАПРД ЭНД КРИПЛД,
МЕЙНТЕЙНИНГ ЗЕ ХОСПИТАЛ
ФО СПЕШЛ СЁРДЖЕРИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Шнайдер Матиас, Рухе Йенс (DE),
Вескамп Джизела, Блобел Карл (US)**

(74) Представитель:

**Ловцов С.В., Вилесов А.С., Гавриков
К.В., Коптева Т.В., Левчук Д.В.,
Стукалова В.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам или их мишень-связывающим фрагментам или мишень-связывающим производным, сохраняющим способности связывать мишень, которые связываются с iRhom2 человека.

Клон №	Kd (нМ)
16-B-03	0,67
16-B-05	1,07
16-B-07	0,99
23-B-04	0,58
42-B-02	0,50
42-B-04	0,48

A1

202392194

202392194

A1

ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ iRhom2

ОПИСАНИЕ

Область техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам против iRhom2.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

ADAM металлопептидазный домен 17 (ADAM17) (NCBI ссылка на человеческий ADAM17: NP_003174), также упоминаемый как TACE (фактор некроза опухоли- α -превращающий фермент), представляет собой фермент, принадлежащий семейству белков ADAM дезинтегринов и металлопротеаз. Это полипептид, состоящий из 824 аминокислот.

Предполагают, что ADAM17 участвует в процессинге фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) на поверхности клетки и внутри внутриклеточных мембран сети транс-Гольджи. Этот процесс, который также известен как «шеддинг», предусматривает расщепление и высвобождение растворимого эктодомена из связанных с мембраной пробелков (таких как про-TNF- α) и имеет известное физиологическое значение. ADAM17 был первой идентифицированной «шеддазой», и также известно, что он играет роль в высвобождении различных цитокинов, заякоренных в мембране, молекул клеточной адгезии, рецепторов, лигандов и ферментов.

Клонирование гена TNF- α выявило, что он кодирует трансмембранный прополипептид типа II массой 26 кДа, который включается в клеточную мембрану в ходе его транслокации в эндоплазматический ретикулум. На клеточной поверхности про-TNF- α является биологически активным и способен вызывать иммунные ответы посредством юкстакринной межклеточной передачи сигналов. Однако про-TNF- α может подвергаться протеолитическому расщеплению по его амидной связи Ala76-Val77, что высвобождает растворимый внеклеточный домен (эктодомен) размером 17 кДа из молекулы про-TNF- α . Этот растворимый эктодомен является цитокином, широко известным как TNF- α , который имеет ключевое значение в паракринной передаче сигналов этой молекулы. Это протеолитическое высвобождение растворимого TNF- α катализируется ADAM17.

ADAM17 также модулирует сигнальный путь киназы MAP, регулируя расщепление лиганда EGFR амфирегулина в молочной железе. ADAM17 важен для активации нескольких лигандов EGFR, TGF α , AREG, EREG, HB-EGF, Epigen. Более того, ADAM17 играет роль в шеддинге L-селектина, молекулы клеточной адгезии.

Недавно было обнаружено, что ADAM17 представляет собой важнейший медиатор формирования резистентности к лучевой терапии. Также было показано, что лучевая терапия активирует ADAM17 при немелкоклеточном раке легкого, что приводит к шеддингу множества факторов выживания, активации пути фактора роста и резистентности к лечению, индуцированной лучевой терапией.

Поскольку ADAM17, как оказалось, является решающим фактором для высвобождения различных патогенных и непатогенных факторов, включая TNF α , он стал объектом пристального внимания в качестве терапевтической молекулы-мишени. По этой причине были предприняты различные попытки разработать ингибиторы ADAM17.

Следовательно, одна из задач настоящего изобретения состоит в предоставлении нового подхода, который позволяет контролировать, регулировать, снижать или ингибировать активность ADAM17.

Другая задача настоящего изобретения состоит в предоставлении нового подхода, позволяющего лечить воспалительные заболевания.

Эти и другие задачи решаются признаками независимых пунктов формулы изобретения. Зависимые пункты формулы изобретения раскрывают варианты осуществления настоящего изобретения, которые могут быть предпочтительными при определенных обстоятельствах. Подобным образом, в описании раскрыты дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения, которые могут быть предпочтительными при определенных обстоятельствах.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится, среди прочего, к гуманизированным антителам, которые связываются с iRhom2 человека. Согласно одному варианту осуществления эти антитела ингибируют и/или снижают активность TACE/ADAM17 при связывании с iRhom2 человека.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены результаты определения аффинности антител с помощью анализа Скэтчарда FACS (сортировка флуоресцентно-активированных клеток) генетически сконструированных мышинных клеточных популяций L929, экспрессирующих T7-меченый полноразмерный (FL) iRhom2 человека дикого типа (WT), эктопически экспрессируемый L929-2041-hiR2-FL-WT-T7 (SEQ ID NO: 49). Эти результаты демонстрируют, что значения KD для связывания гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02

и 42-B-04 с клетками L929-2041-hiR2-FL-WT-T7 находятся в диапазоне от субнанолеярного до низкого нанолеярного.

На фиг. 2а представлены результаты анализов FACS популяций генетически сконструированных мышинных эмбриональных фибробластов (MEF), демонстрирующие, что T7-меченные варианты человеческого и мышинного полноразмерного iRhom2 дикого типа, эктопически экспрессируемые клетками MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7 (SEQ ID NO 49) и MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7 (SEQ ID NO 51), соответственно, локализованы на поверхности этих клеток. *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = анти-T7-антитело.*

На фиг. 2b представлены результаты анализов FACS для определения мышинной перекрестной реактивности антител согласно настоящему изобретению, демонстрирующие, что гуманизованное антитело 16-B-03 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению очевидно распознает вариант iRhom2 человека, эктопически экспрессируемый MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7, но не вариант мышинного iRhom2, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7, и, таким образом, не является перекрестно реагирующим с мышинным iRhom2. *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = антитело 16-B-03*

На фиг. 3а представлены результаты анализов FACS популяций генетически сконструированных MEF, демонстрирующие, что T7-меченные варианты полноразмерного iRhom1 человека дикого типа, эктопически экспрессируемые клетками MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7 (SEQ ID NO 50), и полноразмерный iRhom2 человека дикого типа, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7 (SEQ ID NO 49), соответственно, локализованы на поверхности этих клеток. *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = анти-T7-антитело*

На фиг. 3b представлены результаты анализов FACS для определения специфичности антител согласно настоящему изобретению, демонстрирующие, что гуманизованное антитело 16-B-03 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению в отличие от варианта iRhom2 человека, эктопически экспрессируемого клетками MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7 (SEQ ID NO 49), не распознает близкородственный вариант iRhom1 человека, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7 (SEQ ID NO 50), и, таким образом, является специфическим для iRhom2 человека. *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = антитело 16-B-03*

На фиг. 4а представлены результаты анализов FACS популяций генетически сконструированных MEF, демонстрирующие, что также T7-меченный вариант

полноразмерного iRhom1 макак-резус дикого типа, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Rhesus-iR1-FL-WT-T7 (UniProt идентификатор: F6ZPC8), а также T7-меченный вариант полноразмерного iRhom2 макак-резус дикого типа, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Rhesus-iR2-FL-WT-T7 (UniProt идентификатор: F6Y4X6), соответственно, локализованы на поверхности этих клеток. *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = анти-T7-антитело*

На фиг. 4b представлены результаты анализов FACS для определения перекрестной реактивности антител согласно настоящему изобретению с макаками-резус, демонстрирующие, что гуманизованное антитело 16-B-03 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 очевидно распознает вариант iRhom2 макак-резус, эктопически экспрессируемый MEF-DKO-Rhesus-iR2-FL-WT-T7, но не вариант iRhom1 макак-резус, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Rhesus-iR1-FL-WT-T7, и, таким образом, является перекрестно реагирующим с iRhom2 макак-резус, но не связывается с iRhom1 макак-резус. *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = антитело 16-B-03*

На фиг. 5a представлены результаты анализов FACS популяций генетически сконструированных MEF, демонстрирующие, что также T7-меченный вариант полноразмерного iRhom1 яванских макак дикого типа, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Cyno-iR1-FL-WT-T7 (UniProt идентификатор: A0A2K5TUM2), а также T7-меченный вариант полноразмерного iRhom2 яванских макак дикого типа, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Cyno-iR2-FL-WT-T7 (UniProt идентификатор: A0A2K5TX07), соответственно, локализованы на поверхности этих клеток *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = анти-T7-антитело*

На фиг. 5b представлены результаты анализов FACS для определения перекрестной реактивности антител согласно настоящему изобретению с яванскими макаками, демонстрирующие, что гуманизованное антитело 16-B-03 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 очевидно распознает вариант iRhom2 яванских макак, эктопически экспрессируемый MEF-DKO-Cyno-iR2-FL-WT-T7, но не вариант iRhom1 яванских макак, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Cyno-iR1-FL-WT-T7, и, таким образом, является перекрестно реагирующим с iRhom2 яванских макак, но не с iRhom1 яванских макак. *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = антитело 16-B-03*

На фиг. 6a представлены результаты анализов FACS популяций генетически сконструированных MEF, демонстрирующие, что также T7-меченный вариант

полноразмерного iRhom1 собак дикого типа, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Dog-iR1-FL-WT-T7 (UniProt идентификатор: A0A5F4CNN3), а также T7-меченный вариант полноразмерного iRhom2 собак дикого типа, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Dog-iR2-FL-WT-T7 (UniProt идентификатор: Q00M95), соответственно, локализованы на поверхности этих клеток *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = анти-T7-антитело*

На фиг. 6b представлены результаты анализов FACS для определения перекрестной реактивности антител согласно настоящему изобретению с собакой, демонстрирующие, что гуманизованное антитело 16-B-03 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 очевидно распознает вариант iRhom2 собак, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Dog-iR2-FL-WT-T7, но не вариант iRhom1 собак, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Dog-iR1-FL-WT-T7, и, таким образом, является перекрестно реагирующим с iRhom2 собак, но не связывается с iRhom1 собак. *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = антитело 16-B-03*

На фиг. 7a представлены результаты анализов FACS популяций генетически сконструированных MEF, демонстрирующие, что также T7-меченный вариант полноразмерного iRhom1 кролика дикого типа, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Rabbit-iR1-FL-WT-T7 (UniProt идентификатор: B8K128), а также T7-меченный вариант полноразмерного iRhom2 кролика дикого типа, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Rabbit-iR2-FL-WT-T7 (UniProt идентификатор: G1T7M2), соответственно, локализованы на поверхности этих клеток *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = анти-T7-антитело*

На фиг. 7b представлены результаты анализов FACS для определения перекрестной реактивности антител согласно настоящему изобретению с кроликом, демонстрирующие, что гуманизованное антитело 16-B-03 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 очевидно распознает вариант iRhom2 кролика, эктопически экспрессируемый MEF-DKO-Rabbit-iR2-FL-WT-T7, но не вариант iRhom1 кролика, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-Rabbit-iR1-FL-WT-T7, и, таким образом, является перекрестно реагирующим с iRhom2 кролика, но не связывается с iRhom1 кролика. *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = антитело 16-B-03.*

На фиг. 8a показаны результаты анализов высвобождения TNF α , демонстрирующие, что гуманизованные антитела 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению препятствуют LPS-индуцированному шедингу TNF α в

клетках ТНР-1. Данные иллюстрируют влияние протестированных образцов на абсолютные количества высвобожденного TNF α .

Фиг. 8b относится к результатам, представленным на фиг. 8a, и иллюстрирует влияние протестированных образцов на высвобождение TNF α в процентах ингибирования.

На фиг. 9a показаны результаты анализов высвобождения TNF α , демонстрирующие, что гуманизированные антитела 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению препятствуют РМА-индуцированному шеддингу TNF α в клетках U937. Данные иллюстрируют влияние протестированных образцов на абсолютные количества высвобожденного TNF α .

Фиг. 9b относится к результатам, представленным на фиг. 9a, и иллюстрирует влияние протестированных образцов на высвобождение TNF α в процентах ингибирования.

На фиг. 10a показаны результаты анализов высвобождения IL-6R, демонстрирующие, что гуманизированные антитела 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению препятствуют РМА-индуцированному шеддингу IL-6R в клетках ТНР-1. Данные иллюстрируют влияние протестированных образцов на абсолютные количества высвобожденного IL-6R.

Фиг. 10b относится к результатам, представленным на фиг. 10a, и иллюстрирует влияние протестированных образцов на высвобождение IL-6R в процентах ингибирования.

На фиг. 11a показаны результаты анализов высвобождения IL-6R, демонстрирующие, что гуманизированные антитела 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению препятствуют РМА-индуцированному шеддингу IL-6R в клетках U937. Данные иллюстрируют влияние протестированных образцов на абсолютные количества высвобожденного IL-6R.

Фиг. 11b относится к результатам, представленным на фиг. 11a, и иллюстрирует влияние протестированных образцов на высвобождение IL-6R в процентах ингибирования.

Фиг. 12a показаны результаты анализов высвобождения HB-EGF, демонстрирующие, что гуманизированные антитела 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению препятствуют РМА-индуцированному шеддингу HB-EGF в клетках ТНР-1. Данные иллюстрируют влияние протестированных образцов на абсолютные количества высвобожденного HB-EGF.

Фиг. 12b относится к результатам, представленным на фиг. 12a, и иллюстрирует влияние протестированных образцов на высвобождение HB-EGF в процентах ингибирования.

На фиг. 13a показаны результаты анализов высвобождения HB-EGF, демонстрирующие, что гуманизированные антитела 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-

В-02 и 42-В-04 согласно настоящему изобретению препятствуют РМА-индуцированному шеддингу HB-EGF в клетках U937. Данные иллюстрируют влияние протестированных образцов на абсолютные количества высвобожденного HB-EGF.

Фиг. 13b относится к результатам, представленным на фиг. 13a, и иллюстрирует влияние протестированных образцов на высвобождение HB-EGF в процентах ингибирования.

На фиг. 14a показаны результаты анализов высвобождения TGF α , демонстрирующие, что гуманизированные антитела 16-В-03, 16-В-05, 16-В-07, 23-В-04, 42-В-02 и 42-В-04 согласно настоящему изобретению слабо препятствуют РМА-индуцированному шеддингу TGF α в клетках PC3. Данные иллюстрируют влияние протестированных образцов на абсолютные количества высвобожденного TGF α .

Фиг. 14b относится к результатам, представленным на фиг. 14a, и иллюстрирует влияние протестированных образцов на высвобождение TGF α в процентах ингибирования.

На фиг. 15 представлены результаты анализов FACS для определения специфичности антител согласно настоящему изобретению, демонстрирующие, что гуманизированное антитело 42-В-02 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению связывается с RPMI-8226 (левая панель) и ТНР-1 клетками (средняя панель), обе из которых экспрессируют iRhom2 эндогенно, но не связывается с клетками RH-30 (правая панель), которые не экспрессируют iRhom2 эндогенно, и, таким образом, специфически распознает эндогенный iRhom2 человека. Проанализированные антитела являются результатом транзientной экспрессии соответствующих пар тяжелой цепи/легкой цепи каппа в клетках СНО. *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = гуманизированное антитело 42-В-02*

На фиг. 16a представлены результаты анализов FACS популяций MEF с единичными аминокислотными заменами или делециями в большой внеклеточной петле (AA502 - AA594 человеческого iRhom2), что было генетически сконструировано для определения эпитопа. Данные демонстрируют, что подобно Т7-меченному варианту полноразмерного iRhom2 человека дикого типа, эктопически экспрессируемому клетками MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7, также Т7-меченный вариант iRhom2 человека hiR2-FL-K536A, эктопически экспрессируемый клетками MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7, локализован на поверхности этих клеток. *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = анти-Т7-антитело*

На фиг. 16b показаны результаты анализов высвобождения TGF α (анализы шеддинга), демонстрирующие, что все 137 вариантов iRhom2 человека с единичными аминокислотными заменами или делециями в большой внеклеточной петле (AA502 -

AA594 человеческого iRhom2), за исключением вариантов iRhom2 человека hiR2-FL-C516A, hiR2-FL-F523A, hiR2-FL-C549A, hiR2-FL-D552A, hiR2-FL-C556A, hiR2-FL-P559A, hiR2-FL-W567A, hiR2-FL-W574A и hiR2-FL-C577A, функционально активны и могут в разной степени поддерживать PMA-стимулированный шеддинг TGF α , что указывает на то, что эти варианты наиболее вероятно имеют правильную укладку.

На фиг. 17a представлены результаты анализов FACS для определения эпитопа антител согласно настоящему изобретению. Пример для всей панели из 128 функциональных вариантов iRhom2 человека с единичными аминокислотными заменами или делециями в большой внеклеточной петле (AA502 - AA594 человеческого iRhom2), показаны данные по анализу клеток MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7, эктопически экспрессирующих вариант iRhom2 человека hiR2-FL-K536A. Данные демонстрируют, что замена одной аминокислоты лейцин 536 в iRhom2 человека на аланин сильно влияет и, таким образом, способствует связыванию гуманизованного антитела 42-B-02 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению. *Окрашивание: серый = только вторичное антитело, черный = гуманизованное антитело 42-B-02*

На фиг. 17b обобщены результаты анализов FACS всех антител согласно настоящему изобретению для всей панели из 128 сконструированных функциональных популяций MEF, эктопически экспрессирующих варианты iRhom2 человека с единичными аминокислотными заменами или делециями в большой внеклеточной петле (AA502 - AA594 человеческого iRhom2). Данные показывают родственные паттерны положений аминокислот, релевантных для связывания iRhom2 антител согласно настоящему изобретению.

На фиг. 18a показаны результаты анализов высвобождения TNF α , демонстрирующие, что все антитела согласно настоящему изобретению препятствуют LPS-индуцированному шеддингу TNF α в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC), выделенных у здоровых доноров. Данные иллюстрируют влияние протестированных образцов на абсолютные количества высвобожденного TNF α . Проанализированные гуманизованные антитела являются результатом транзientной экспрессии соответствующих пар тяжелой цепи/легкой цепи каппа в клетках CHO.

Фиг. 18b относится к результатам, представленным на фиг. 18a, и иллюстрирует влияние протестированных образцов на высвобождение TNF α в процентах ингибирования.

На фиг. 19a показаны результаты анализов высвобождения IL-6R, демонстрирующие, что все антитела согласно настоящему изобретению препятствуют PMA-индуцированному шеддингу IL-6R в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC), выделенных у здоровых доноров. Данные иллюстрируют влияние

протестированных образцов на абсолютные количества высвобожденного IL-6R. Проанализированные гуманизированные антитела являются результатом транзientной экспрессии соответствующих пар тяжелой цепи/легкой цепи каппа в клетках CHO.

Фиг. 19b относится к результатам, представленным на фиг. 19a, и иллюстрирует влияние протестированных образцов на высвобождение IL-6R в процентах ингибирования.

На фиг. 20a показаны результаты анализов высвобождения HB-EGF, демонстрирующие, что все антитела согласно настоящему изобретению препятствуют РМА-индуцированному шеддингу HB-EGF в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC), выделенных у здоровых доноров. Данные иллюстрируют влияние протестированных образцов на абсолютные количества высвобожденного HB-EGF. Проанализированные гуманизированные антитела являются результатом транзientной экспрессии соответствующих пар тяжелой цепи/легкой цепи каппа в клетках CHO.

Фиг. 20b относится к результатам, представленным на фиг. 20a, и иллюстрирует влияние протестированных образцов на высвобождение HB-EGF в процентах ингибирования.

На фиг. 21a показаны результаты анализов моделей септического шока *in vivo* у генетически гуманизированных мышей, демонстрирующие, что гуманизированное антитело 42-B-02 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению препятствует LPS-индуцированному шеддингу TNF α у генетически гуманизированных мышей. Данные иллюстрируют влияние протестированного образца на абсолютные количества высвобождаемого TNF α . Проанализированные гуманизированные антитела являются результатом транзientной экспрессии соответствующих пар тяжелой цепи/легкой цепи каппа в клетках CHO.

Фиг. 21b относится к результатам, представленным на фиг. 21a, и иллюстрирует влияние протестированного образца на высвобождение TNF α в процентах по сравнению с контрольными животными, обработанными буфером, которые были установлены как 100%.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, связывающему iRhom2, или его мишень-связывающему фрагменту или мишень-связывающему производному, сохраняющим способности связывать мишень, которые

а) содержат набор из трех определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи и трех определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи,

содержащийся в одной из следующих пар последовательностей переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи

- SEQ ID NO 1 и 5,
- SEQ ID NO 9 и 13,
- SEQ ID NO 17 и 21,
- SEQ ID NO 25 и 29,
- SEQ ID NO 33 и 37 или
- SEQ ID NO 41 и 45,

b) содержат набор из трех определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи и трех определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи, выбранный из

- SEQ ID NO 2, 3, 4, 6, 7 и 8,
- SEQ ID NO 10, 11, 12, 14, 15 и 16,
- SEQ ID NO 18, 19, 20, 22, 23 и 24,
- SEQ ID NO 26, 27, 28, 30, 31 и 32,
- SEQ ID NO 34, 35, 36, 38, 39 и 40 или
- SEQ ID NO 42, 43, 44, 46, 47 и 48,

c) содержат набор определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи/легкой цепи согласно b), при условии, что по меньшей мере одна из CDR имеет до 3 аминокислотных замен относительно соответствующих SEQ ID NO, и/или

d) содержат набор определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи/легкой цепи согласно b) или c), при условии, что по меньшей мере одна из CDR имеет идентичность последовательности $\geq 66\%$ с соответствующими CDR, содержащимися в последовательностях SEQ ID NO.

CDR включены в подходящий белковый каркас, предпочтительно а каркас переменного домена, так, чтобы обладать способностью связываться с iRhom2 человека.

Согласно одному варианту осуществления CDR определены в соответствии с определением согласно Кабату, Chothia или MacCallum, предпочтительно CDR определены в соответствии с нумерацией, как представлено в Таблице 1.

Способы получения и/или отбора гуманизованных моноклональных антител известны в данной области техники. Например, в US6331415 (Genentech) описано получение химерных антител, в то время как в US6548640 (Medical Research Council) описаны способы прививки CDR, а в US5859205 (Celltech) описано получение гуманизованных антител.

Гуманизированные антитела представляют собой антитела, в которых определяющие комплементарность области происходят из родительского антитела, полученного от вида, отличного от человека, и привиты в каркас (по меньшей мере, переменный домен) человеческого антитела, такого как, например, IgG1, IgG2 или IgG4. Гуманизированное антитело связывается с той же мишенью, что и родительское антитело, но из-за его прививки в человеческий каркас имеет пониженную иммуногенность (например, ответ НАМА). По этой причине гуманизированное антитело структурно отличается от родительского (например, мышинового) антитела.

При гуманизации за стадией прививки CDR в каркас человека часто следует стадия созревания аффинности для повторного приобретения аффинности, утраченной в процессе прививки. Этот процесс дополнительно модифицирует последовательность человеческого антитела, включая его CDR.

Согласно одному варианту осуществления CDR включены в подходящий белковый каркас, так, чтобы обладать способностью ингибировать или снижать активность TACE/ADAM17.

Неактивный член ромбовидного семейства 2 (iRhom2) представляет собой белок, который у человека кодируется геном RHBD2. Это трансмембранный белок, состоящий из приблизительно 850 аминокислот, имеющий семь трансмембранных доменов.

iRhom2 существует в различных изоформах. Эксперименты согласно настоящему изобретению проводили с изоформой, определенной как NCBI ссылочный номер NP_078875.4. Однако, настоящее изобретение охватывает без ограничения другие изоформы iRhom2, как показано в следующей таблице:

мРНК	Белок	Название
NM_024599.5	NP_078875.4	неактивный ромбовидный белок 2 вариант транскрипта 1/ изоформа 1
NM_001005498.3	NP_001005498.2	неактивный ромбовидный белок 2 вариант транскрипта 2/ изоформа 2

В контексте настоящего изобретения термин «ингибирует и/или снижает активность TACE/ADAM17» описывает эффект, вызываемый антителом или фрагментом, который блокирует или снижает активность TACE/ADAM17, как измерено, например, согласно соответствующему анализу шеддинга (см., например, фиг. 8 и пример 6).

ADAM металлопептидазный домен 17 (ADAM17), также называемый TACE (фактор некроза опухоли- α -превращающий фермент), представляет собой фермент, принадлежащий к семейству белков ADAM дезинтегринов и металлопротеаз. Предполагают, что ADAM17 участвует в процессинге фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) на поверхности клетки и внутри внутриклеточных мембран сети транс-Гольджи. Этот процесс, который также известен как «шеддинг», предусматривает расщепление и высвобождение растворимого эктодомена из связанных с мембраной пробелков (таких как про-TNF- α) и имеет известное физиологическое значение. ADAM17 был первой идентифицированной «шеддазой», и также известно, что он играет роль в высвобождении различных цитокинов, заякоренных в мембране, молекул клеточной адгезии, рецепторов, лигандов и ферментов.

Клонирование гена TNF- α выявило, что он кодирует трансмембранный прополипептид типа II массой 26 кДа, который включается в клеточную мембрану в ходе его транслокации в эндоплазматический ретикулум. На клеточной поверхности про-TNF- α является биологически активным и способен вызывать иммунные ответы посредством юкстакринной межклеточной передачи сигналов. Однако про-TNF- α может подвергаться протеолитическому расщеплению по его амидной связи Ala76-Val77, что высвобождает растворимый внеклеточный домен (эктодомен) размером 17 кДа из молекулы про-TNF- α . Этот растворимый эктодомен является цитокином, широко известным как TNF- α , который имеет ключевое значение в паракринной передаче сигналов этой молекулы. Это протеолитическое высвобождение растворимого TNF- α катализируется ADAM17.

Недавно было обнаружено, что ADAM17 представляет собой важный медиатор резистентности к лучевой терапии. Также было показано, что лучевая терапия активирует ADAM17 при немелкоклеточном раке легкого, что приводит к потере множества факторов выживания, активации пути фактора роста и резистентности к лечению, вызванной лучевой терапией.

ADAM17 также регулирует сигнальный путь киназы MAP, регулируя шеддинг лиганда EGFR амфирегулина в молочной железе. ADAM17 также играет роль в шеддинге L-селектина, молекулы клеточной адгезии.

В контексте настоящего изобретения термин «CDR» или «определяющая комплементарность область» предназначен для обозначения несмежных антигенсвязывающих сайтов, обнаруживаемых в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эти конкретные области были описаны Kabat et al. (1977), Kabat et al. (1991), Chothia et al. (1987) и MacCallum et al., (1996), где определения включают перекрывающиеся или поднаборы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом.

Однако предполагают, что применение любого определения для обозначения CDR антитела или привитых антител или их вариантов охватывается термином, как определено и использовано в настоящем документе. Аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено в каждой из процитированных выше ссылок, представлены ниже в Таблице 1 в качестве сравнения.

Таблица 1. Определения CDR

	Кабат	Chothia	MacCallum
VH CDR1	31-35	26-32	30-35
VH CDR2	50-65	53-55	47-58
VH CDR3	95-102	96-101	93-101
VL CDR1	24-34	26-32	30-36
VL CDR2	50-56	50-52	46-55
VL CDR3	89-97	91-96	89-96

В контексте настоящего изобретения термин «каркас» при использовании в отношении варибельного домена антитела введен для обозначения всех аминокислотных остатков за пределами областей CDR в пределах варибельного домена антитела. Таким образом, длина каркаса варибельного домена составляет приблизительно 100-120 аминокислот, но предназначена для ссылки только на те аминокислоты, которые находятся вне CDR.

В контексте настоящего изобретения термин «способен связываться с мишенью X» следует понимать как означающий, что соответствующий связывающий домен связывает мишень с K_D 10^{-4} или менее. K_D представляет собой равновесную константу диссоциации, соотношение k_{off}/k_{on} , между антителом или фрагментом и его антигеном. K_D и аффинность обратно пропорциональны. Значение K_D относится к концентрации антитела или фрагмента (количество антитела или фрагмента, необходимое для конкретного эксперимента), и поэтому, чем ниже значение K_D (более низкая концентрация), тем следовательно выше аффинность связывающего домена. В следующей таблице показаны типичные диапазоны K_D моноклональных антител

Таблица 2. K_D и молярные значения

Значение K_D	Молярный диапазон
10^{-4} - 10^{-6}	микромольный (мкМ)

$10^{-7} - 10^{-9}$	наномолярный (нМ)
$10^{-10} - 10^{-12}$	пикомолярный (пМ)
$10^{-13} - 10^{-15}$	фемтомолярный (фМ)

Предпочтительно антитело или фрагмент имеет до 2 аминокислотных замен, и более предпочтительно до 1 аминокислотной замены.

Предпочтительно по меньшей мере одна из CDR антитела или фрагмента имеет идентичность последовательности $\geq 67\%$, $\geq 68\%$, $\geq 69\%$, $\geq 70\%$, $\geq 71\%$, $\geq 72\%$, $\geq 73\%$, $\geq 74\%$, $\geq 75\%$, $\geq 76\%$, $\geq 77\%$, $\geq 78\%$, $\geq 79\%$, $\geq 80\%$, $\geq 81\%$, $\geq 82\%$, $\geq 83\%$, $\geq 84\%$, $\geq 85\%$, $\geq 86\%$, $\geq 87\%$, $\geq 88\%$, $\geq 89\%$, $\geq 90\%$, $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$ и наиболее предпочтительно 100% с соответствующей SEQ ID NO.

«Процент идентичности последовательности» в контексте настоящего изобретения определен путем сравнения двух оптимально выровненных биопоследовательностей (аминокислотных последовательностей или полинуклеотидных последовательностей) в окне сравнения, где часть соответствующей последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью, которая не содержит добавлений или делеций, для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент вычисляют путем определения количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или идентичный аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, с получением количества совпадающих положений, путем деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательности.

Термины «идентичная» или процент «идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одними и теми же последовательностями. Две последовательности являются «по существу идентичными», если две последовательности имеют определенный процент одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов (т.е. идентичность последовательности по меньшей мере 85% , 90% , 95% , 96% , 97% , 98% или 99% в конкретной области или, если не указано, по всей последовательности эталонной последовательности), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия по окну сравнения или обозначенному участку, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или с помощью ручного выравнивания и визуального осмотра. Настоящее раскрытие охватывает полипептиды, которые по существу идентичны полипептидам, приведенным в качестве

примеров в настоящем документе. Что касается аминокислотных последовательностей, идентичность или идентичность по существу может существовать в области, которая имеет длину по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 аминокислот, необязательно по меньшей мере приблизительно 25, 30, 35, 40, 50, 75 или 100 аминокислот в длину, необязательно по меньшей мере приблизительно 150, 200 или 250 аминокислот в длину или по всей длине эталонной последовательности. Что касается более коротких аминокислотных последовательностей, например, аминокислотных последовательностей из 20 или менее аминокислот, идентичность по существу существует, когда один или два аминокислотных остатка консервативно замещены в соответствии с консервативными заменами, определенными в настоящем документе.

Предпочтительно по меньшей мере одна из CDR была подвергнута модификации последовательности CDR, включая

- созревание аффинности
- снижение иммуногенности

Созревание аффинности представляет собой процесс, посредством которого аффинность данного антитела увеличивается *in vitro*. Подобно природному аналогу, созревание аффинности *in vitro* основано на принципах мутации и отбора. Оно успешно используется для оптимизации антител, фрагментов антител или других пептидных молекул, таких как миметики антител. Случайные мутации внутри CDR вводятся с помощью радиации, химических мутагенов или допускающей ошибки ПЦР. Кроме того, генетическое разнообразие может быть увеличено посредством перестановки цепей. Два или три раунда мутации и отбора с использованием таких способов отображения, как фаговый дисплей, обычно приводят к получению фрагментов антител с аффинностью в низком наномолярном диапазоне. Принципы см. в Eysenbach et al. (2016) или US20050169925A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в поддерживающих целях.

Сконструированные антитела содержат области CDR, полученные из мышиной последовательности, которые были привиты, наряду с любыми необходимыми обратными мутациями каркаса в V-областях, происходящих из последовательности. Следовательно, сами CDR могут вызывать иммуногенные реакции при введении пациенту гуманизованного антитела. Способы снижения иммуногенности, вызванной CDR, раскрыты в Harding et al. (2010), или US2014227251A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в поддерживающих целях.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент содержит

а) пары переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи (HCVD/LCVD), представленные в следующих парах SEQ ID NO:

- 1 и 5,
- 9 и 13,
- 17 и 21,
- 25 и 29,
- 33 и 37 и/или
- 41 и 45,

б) пары переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи (HCVD/LCVD) согласно а), при условии, что

- HCVD имеет идентичность последовательности $\geq 80\%$ с соответствующей SEQ ID NO, и/или
- LCVD имеет идентичность последовательности $\geq 80\%$ с соответствующей SEQ ID NO,

в) пары переменных доменов (VD) тяжелой цепи/легкой цепи согласно а) или б), при условии, что по меньшей мере один из HCVD или LCVD имеет до 10 аминокислотных замен относительно соответствующей SEQ ID NO,

причем указанное антитело или фрагмент все еще способны связываться с iRhom2 человека и/или ингибировать или снижать активность TACE/ADAM17.

«Переменный домен» при использовании в отношении антитела или его тяжелой цепи или легкой цепи предназначен для обозначения части антитела, которая обеспечивает связывание антигена на молекуле и которая не является константной областью. Предполагается, что этот термин включает его функциональные фрагменты, которые частично сохраняют связывающую функцию всей переменной области. Фрагменты связывания переменной области включают, например, функциональные фрагменты, такие как Fab, F(ab)₂, Fv, одноцепочечный Fv (scfv) и т.п. Такие функциональные фрагменты хорошо известны специалистам в данной области техники. Соответственно, предполагается, что использование этих терминов при описании функциональных фрагментов гетеромерной переменной области соответствует определениям, хорошо известным специалистам в данной области техники. Такие термины описаны, например, в Huston et al., (1993) или Plückthun and Skerra (1990).

Предпочтительно HCVD и/или LCVD имеет идентичность последовательности $\geq 81\%$, $\geq 82\%$, $\geq 83\%$, $\geq 84\%$, $\geq 85\%$, $\geq 86\%$, $\geq 87\%$, $\geq 88\%$, $\geq 89\%$, $\geq 90\%$, $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, \geq

93 %, ≥ 94 %, ≥ 95 %, ≥ 96 %, ≥ 97 %, ≥ 98 %, ≥ 99 % или наиболее предпочтительно 100 % с соответствующей SEQ ID NO.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой консервативную аминокислотную замену.

«Консервативная аминокислотная замена» в контексте настоящего изобретения оказывает меньшее влияние на функцию антитела, чем неконсервативная замена. Хотя существует множество способов классификации аминокислот, их часто делят на шесть основных групп на основе их структуры и общих химических характеристик их R групп.

Согласно некоторым вариантам осуществления «консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим подобную боковую цепь. Например, в данной области техники были определены семейства аминокислотных остатков, имеющих подобные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с

- основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин),
- кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота),
- незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин),
- неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан),
- бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и
- ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Другие консервативные аминокислотные замены также могут происходить между семействами боковых цепей аминокислот, например, при замене аспарагина на аспарагиновую кислоту для изменения заряда пептида. Консервативные замены могут дополнительно включать замену на химически гомологичные неприродные аминокислоты (например, синтетическая неприродная гидрофобная аминокислота вместо лейцина, синтетическая неприродная ароматическая аминокислота вместо триптофана).

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент имеет по меньшей мере одно из

- аффинности связывания с мишенью $\geq 50\%$ с iRhom2 человека по сравнению с этой аффинностью связывания с мишенью антитела или фрагмента по любому из вышеуказанных пунктов, и/или
- $\geq 50\%$ от ингибирующего или снижающего эффекта в отношении активности TACE/ADAM17 антитела или фрагмента по любому из вышеуказанных пунктов.

В контексте настоящего изобретения термин «аффинность связывания» предназначен для обозначения силы взаимодействия связывания и, следовательно, включает как фактическую аффинность связывания, так и кажущуюся аффинность связывания. Фактическая аффинность связывания представляет собой отношение скорости ассоциации к скорости диссоциации. Следовательно, придание или оптимизация аффинности связывания включает изменение одного или обоих этих компонентов для достижения желаемого уровня аффинности связывания. Кажущаяся аффинность может включать, например, avidность взаимодействия. Например, двухвалентный гетеромерный связывающий фрагмент переменной области может проявлять измененную или оптимизированную аффинность связывания благодаря своей валентности.

Подходящим способом измерения аффинности связывающего агента является поверхностный плазмонный резонанс (SPR). Этот способ основан на явлении, возникающем при возбуждении волн поверхностных плазмонов на границе раздела металл/жидкость. Свет направляется и отражается от стороны поверхности, не находящейся в контакте с образцом, а SPR вызывает снижение интенсивности отраженного света при определенной комбинации угла и длины волны. События биомолекулярного связывания вызывают изменения показателя преломления в поверхностном слое, которые обнаруживаются как изменения сигнала SPR. Событием связывания может быть либо связывающая ассоциация, либо диссоциация между парой рецептор-лиганд. Изменения показателя преломления могут быть измерены по существу мгновенно и, следовательно, позволяют определять отдельные компоненты константы скорости. В частности, способ позволяет точно измерять скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}).

Измерения значений k_{on} и k_{off} могут быть предпочтительными, поскольку они могут идентифицировать измененные переменные области или оптимизированные переменные области, которые терапевтически более эффективны. Например, измененная переменная область или ее гетеромерный связывающий фрагмент могут быть более эффективными, поскольку они имеют, например, более высокую оцененную k_{on} по сравнению с переменными областями и гетеромерными связывающими фрагментами, которые проявляют подобную аффинность связывания. Повышенная эффективность достигается посредством того, что молекулы с более высокими значениями k_{on} могут

специфически связывать и ингибировать свою мишень с большей скоростью. Подобным образом, молекула согласно настоящему изобретению может быть более эффективной, поскольку она демонстрирует более низкое значение k_{off} по сравнению с молекулами, имеющими подобную аффинность связывания. Повышенная эффективность, наблюдаемая у молекул, имеющих более низкие скорости k_{off} , может наблюдаться, поскольку после связывания молекулы медленнее диссоциируют от своей мишени. Несмотря на раскрытие со ссылкой на измененные переменные области и оптимизированные переменные области согласно настоящему изобретению, включая связывающие фрагменты гетеромерной переменной области, способы, описанные выше для измерения скорости ассоциации и диссоциации, применимы по существу к любому антителу или фрагменту или его фрагменту для идентификации более эффективных связывающих для терапевтических или диагностических целей.

Другим подходящим способом измерения аффинности связывающего агента является поверхностный анализ с помощью анализа FACS/Скэтчарда. См., среди прочего, пример 1 для соответствующего описания.

Способы измерения аффинности, включая скорости ассоциации и диссоциации с использованием поверхностного плазмонного резонанса, хорошо известны в данной области техники и могут быть обнаружены, например, в Jonsson and Malmquist, (1992) и Wu et al. (1998). Более того, одним устройством, хорошо известным в данной области техники для измерения взаимодействий связывания, является устройство VIAcore 2000, которое коммерчески доступно у Pharmacia Biosensor, (Uppsala, Sweden).

Предпочтительно указанная аффинность связывания с мишенью составляет $\geq 51\%$, $\geq 52\%$, $\geq 53\%$, $\geq 54\%$, $\geq 55\%$, $\geq 56\%$, $\geq 57\%$, $\geq 58\%$, $\geq 59\%$, $\geq 60\%$, $\geq 61\%$, $\geq 62\%$, $\geq 63\%$, $\geq 64\%$, $\geq 65\%$, $\geq 66\%$, $\geq 67\%$, $\geq 68\%$, $\geq 69\%$, $\geq 70\%$, $\geq 71\%$, $\geq 72\%$, $\geq 73\%$, $\geq 74\%$, $\geq 75\%$, $\geq 76\%$, $\geq 77\%$, $\geq 78\%$, $\geq 79\%$, $\geq 80\%$, $\geq 81\%$, $\geq 82\%$, $\geq 83\%$, $\geq 84\%$, $\geq 85\%$, $\geq 86\%$, $\geq 87\%$, $\geq 88\%$, $\geq 89\%$, $\geq 90\%$, $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$ и наиболее предпочтительно $\geq 99\%$ по сравнению с этой аффинностью связывания эталонного связывающего агента.

В контексте настоящего изобретения количественную оценку ингибирующего или снижающего эффекта в отношении активности TACE/ADAM17 по сравнению с эталонным связывающим агентом проводят с помощью подходящего анализа для определения эффекта шединга TNF α , как описано, например, на фиг. 8. и в примере 6.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, которое связывается с iRhom2 человека и конкурирует за связывание с iRhom2 человека с

- a) антителом согласно описанию выше и/или
- b) антителом, выбранным из группы, состоящей из клонов 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и/или 42-B-04.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, которое связывается по существу с той же или с той же областью на iRhom2 человека, что и

- a) антитело согласно описанию выше и/или
- b) антитело, выбранное из группы, состоящей из клонов 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02, и/или 42-B-04.

Клоны 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 идентифицированы в таблице последовательностей, приведенной в настоящем документе.

В контексте настоящего изобретения термин «область» следует понимать как означающий внеклеточную область, домен, субдомен или вторичную структуру (например, петлю) или предпочтительно эпитоп.

Что касается формата или структуры такого антитела или фрагмента, применяются такие же предпочтительные варианты осуществления, как указано выше. Согласно одному варианту осуществления указанное антитело или фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его мишень-связывающий фрагмент или мишень-связывающее производное, сохраняющие способности связывать мишень, или миметик антитела.

В контексте настоящего изобретения термин «конкурирует за связывание» применяют в отношении одного из антител, определенных последовательностями, как указано выше, что означает, что фактическое антитело или фрагмент в качестве активности связывается с той же мишенью, или целевым эпитопом, или доменом, или субдоменом, что и указанное определенное последовательностью антитело или фрагмент, и является вариантом последнего. Эффективность (например, кинетическая или термодинамическая) связывания может быть такой же, или выше, или ниже эффективности последнего. Например, равновесная константа связывания для связывания с субстратом может различаться для двух антител.

Такую конкуренцию за связывание можно надлежащим образом измерить с помощью анализа конкурентного связывания. Такие анализы раскрыты в Finco et al. 2011, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в поддерживающих целях, а их значение для толкования формулы изобретения раскрыто в Deng et al 2018, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в поддерживающих целях.

Для исследования этой характеристики доступны подходящие технологии картирования эпитопов, включающие, среди прочего,

- рентгеновскую сокристаллографию и криогенную электронную микроскопию (cryo-EM)
- сканирование олигопептидов на основе массива
- картирование сайт-направленного мутагенеза
- картирование эпитопа с мутагенезом методом дробовика высокой пропускной способности
- водородно-дейтериевый обмен
- масс-спектрометрия с введением перекрестных сшивок

Эти способы, среди прочего, раскрыты и описаны в Vanik et al (2010) и DeLisser (1999), содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в поддерживающих целях.

Согласно одному варианту осуществления антитело или фрагмент при связывании с iRhom2 человека связывается по меньшей мере в его области петли 1. Петля 1 в Rhom2 содержит аминокислотные остатки 474 – 660 согласно SEQ ID NO 49.

Согласно другому варианту осуществления антитело или фрагмент не связываются с околочелювочным доменом (JMD), расположенным на N-концевой стороне петли 1.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения ингибирование или снижение активности TACE/ADAM17 вызвано вмешательством антитела или фрагмента в iRhom2-опосредованную активацию TACE/ADAM17 или взаимодействие TACE/ADAM17 с другими белками, включая молекулы субстрата.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент при связывании с iRhom2 человека ингибируют или снижают индуцированный шеддинг TNF α .

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент при связывании с iRhom2 человека ингибируют или снижают индуцированный шеддинг IL-6R.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент при связывании с iRhom2 человека ингибируют или снижают индуцированный шеддинг HB-EGF.

Шеддинг или высвобождение фактора некроза опухоли альфа (TNF α) в контексте настоящего изобретения относятся к процессу, при котором заякоренный в мембране фактор некроза опухоли альфа (mTNF α /про-TNF α) после расщепления высвобождается в

окружающую среду, превращаясь в растворимый TNF α (sTNF α или просто TNF α). Этот процесс, среди прочего, инициируется TACE/ADAM17.

Высвобождение или шеддинг рецептора интерлейкина 6 (IL-6R) относятся к процессу, при котором растворимый IL-6R образуется путем протеолитического расщепления мембраносвязанного IL-6R на поверхности клетки в протеолитическом сайте, близком к его трансмембранному домену, посредством TACE/ADAM17

Высвобождение или шеддинг гепарин-связывающего EGF-подобного фактора роста (HB-EGF) относятся к процессу расщепления, при котором растворимая форма HB-EGF образуется и высвобождается с клеточной поверхности. Гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста, эпидермальный фактор роста со средством к гепарину, синтезируется в виде заякоренного к мембране митогенного и хемотаксического гликопротеина. Впервые идентифицированный в кондиционированных средах макрофагоподобных клеток человека, HB-EGF представляет собой гликопротеин из 87 аминокислот, который демонстрирует строго регулируемую экспрессию генов.

Подходящие анализы для определения эффекта шеддинга TNF α описаны, например, на фиг. 8 и в Примере 6. Подходящие анализы для определения высвобождения или шеддинга IL-6R и/или HB-EGF описаны, например, на фиг. 10 и в Примере 8 или на фиг. 12 и в Примере 10, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения iRhom2 человека, с которым антитело или фрагмент связывается, содержит

- a) аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO 49, или
- b) аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO 49, при условии, что указанная последовательность сохраняет активность iRhom2.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRhom2 человека содержит аминокислотную последовательность, которая имеет $\geq 81\%$, предпочтительно $\geq 82\%$, более предпочтительно $\geq 83\%$, $\geq 84\%$, $\geq 85\%$, $\geq 86\%$, $\geq 87\%$, $\geq 88\%$, $\geq 89\%$, $\geq 90\%$, $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, ≥ 98 или наиболее предпочтительно ≥ 99 % идентичности последовательности с SEQ ID NO 49.

SEQ ID NO 49 представляет собой аминокислотную последовательность изоформы 1 неактивного ромбовидного белка 2 (iRhom2) [Homo sapiens], доступную по NCBI ссылочному номеру NP_078875.4. Как правило, существуют различные варианты и изоформы iRhom2. Аналогично, существуют или могут существовать мутанты, содержащие консервативные или молчащие аминокислотные замены, которые сохраняют полную или по меньшей мере существенную активность iRhom2. Эти изоформы, варианты

и мутанты охватываются диапазоном идентичности, указанным выше, однако это означает, что дисфункциональные, неактивные варианты и мутанты исключены.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент представляют собой моноклональное антитело или его мишень-связывающий фрагмент или мишень-связывающее производное, сохраняющие способность связывать мишень.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент находятся в по меньшей мере одном из форматов, выбранных из группы, состоящей из IgG, scFv, Fab или (Fab)₂.

В контексте настоящего изобретения термин «моноклональное антитело (mAb)» относится к композиции антител, имеющей гомогенную популяцию антител, т.е. гомогенную популяцию, состоящую из целого иммуноглобулина или его фрагмента или производного, сохраняющих способности связывать мишень.

Особенно предпочтительно такое антитело представляет собой антитело IgG или его фрагмент или производное, сохраняющее способности связывать мишень. Иммуноглобулин G (IgG) представляет собой тип антитела. Составляя приблизительно 75% сывороточных антител у людей, IgG является наиболее распространенным типом антител, обнаруживаемых в кровотоке. Молекулы IgG создаются и высвобождаются В-клетками плазмы. Каждый IgG имеет два антигенсвязывающих сайта.

Антитела IgG представляют собой большие молекулы с молекулярной массой приблизительно 150 кДа, состоящие из четырех пептидных цепей. Они содержат две идентичные тяжелые цепи класса γ массой приблизительно 50 кДа и две идентичные легкие цепи массой приблизительно 25 кДа, таким образом, тетрамерную четвертичную структуру. Две тяжелые цепи связаны друг с другом и с легкой цепью в каждом случае посредством дисульфидных связей. Полученный тетрамер имеет две идентичные половины, которые вместе образуют Y-образную форму. Каждый конец вилки содержит идентичный антигенсвязывающий сайт. Fc-области IgG несут высококонсервативный сайт N-гликозилирования. N-гликаны, присоединенные к этому сайту, преимущественно представляют собой фукозилированные в ядре диантенные структуры сложного типа. Кроме того, небольшие количества этих N-гликанов также несут пополам GlcNAc и α -2,6-связанные остатки сиаловой кислоты.

У людей существует четыре подкласса IgG (IgG1, 2, 3 и 4), названные в порядке их распространенности в сыворотке (IgG1 является наиболее распространенным).

В контексте настоящего изобретения термин «фрагмент» относится к фрагментам такого антитела, сохраняющим способность связывать мишень, например,

- CDR (определяющая комплементарность область)
- гипервариабельный домен,
- вариабельный домен (Fv)
- тяжелая цепь IgG или IgM (состоящая из областей VH, CH1, шарнир, CH2 и CH3)
- легкая цепь IgG или IgM (состоящая из областей VL и CL), и/или
- Fab и/или F(ab)₂.

В контексте настоящего изобретения термин «производное» должен относиться к белковым конструкциям, которые структурно отличаются от общепринятой концепции антител, но все же имеют некоторое структурное родство с общепринятой концепцией антител, например, scFv, Fab и/или F(ab)₂, а также би-, три- или более специфичным конструкциям антител, сохраняющим способности связывать мишень. Все эти элементы поясняются ниже.

Другими производными антител, известными специалисту в данной области техники, являются диатела, верблюжьих антитела, нанотела, доменные антитела, двухвалентные гомодимеры с двумя цепями, состоящие из scFv, IgA (две структуры IgG, соединенные J-цепью и секреторный компонент), антитела акулы, антитела, состоящие из каркаса примата Нового света плюс CDR, не происходящих из примата Нового света, димеризованные конструкции, содержащие CH3+VL+VH, и конъюгаты антител (например, антитело или его фрагменты или производные, связанные с токсином, цитокином, радиоизотопом или меткой). Эти типы хорошо описаны в литературе и могут быть использованы специалистом в данной области техники на основе настоящего раскрытия без дополнительной изобретательской активности.

Способы получения гибридной клетки раскрыты в Köhler & Milstein (1975).

Способы получения и/или отбора полностью человеческих моноклональных антител известны в данной области техники. Они могут предусматривать применение трансгенного животного, которое иммунизировано соответствующим белком или пептидом, или применение подходящего метода отображения, такого как дрожжевой дисплей, фаговый дисплей, дисплей В-клеток или рибосомный дисплей, где проводят скрининг антител из библиотеки против iRhom2 человека в стационарной фазе.

Библиотеки антител *in vitro*, среди прочего, раскрыты в US6300064 от MorphoSys и US 6248516 от MRC/Scripps/ Stratagene. Способы фагового дисплея, например, раскрыты в US5223409 от Duax. Платформы трансгенных млекопитающих описаны, например, в EP1480515A2 от TaconicArtemis.

IgG, IgM, scFv, Fab и/или F(ab)₂ представляют собой форматы антител, хорошо известные специалистам в данной области техники. Соответствующие вспомогательные методы доступны в соответствующих учебниках.

В контексте настоящего изобретения термин «Fab» относится к фрагменту IgG/IgM, содержащему антигенсвязывающую область, причем указанный фрагмент состоит из одного константного и одного вариабельного домена из каждой тяжелой и легкой цепей антитела.

В контексте настоящего изобретения термин «F(ab)₂» относится к фрагменту IgG/IgM, состоящему из двух фрагментов Fab, соединенных друг с другом дисульфидными связями.

В контексте настоящего изобретения термин «scFv» относится к одноцепочечному вариабельному фрагменту, представляющему собой слияние вариабельных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов, связанных вместе коротким линкером, обычно серином (S) или глицином (G). Эта химерная молекула сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкерного пептида.

Модифицированные форматы антител представляют собой, например, конструкции би- или триспецифических антител, слитые белки на основе антител, иммуноконъюгаты и т.п. Эти типы хорошо описаны в литературе и могут быть использованы специалистом в данной области техники на основе настоящего раскрытия с добавлением дополнительной изобретательской активности.

В контексте настоящего изобретения термин «миметик антитела» относится к органической молекуле, чаще всего к белку, которая специфически связывается с белком-мишенью, подобно антителу, но структурно не связана с антителами. Миметики антител обычно представляют собой искусственные пептиды или белки с молекулярной массой приблизительно от 3 до 20 кДа. Определение охватывает, среди прочего, молекулы аффилины, аффимеры, аффитины, алифатела, антикалии, авимеры, дарпины, финомеры, пептиды с доменом Куница, монотела и наноCLAMP.

Согласно одному или нескольким вариантам осуществления антитело или фрагмент представляет собой выделенное антитело или его мишень-связывающий фрагмент или мишень-связывающее производное, сохраняющие способность связывать мишень, или выделенный миметик антитела.

Согласно одному или нескольким вариантам осуществления антитело представляет собой сконструированное или рекомбинантное антитело или его мишень-связывающий

фрагмент или мишень-связывающее производное, сохраняющие способность связывать мишень, или, или сконструированный или рекомбинантный миметик антитела.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент представляет собой антитело в по меньшей мере одном из форматов, выбранных из группы, состоящей из IgG, scFv, Fab или (Fab)₂.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент не являются перекрестно реагирующими с iRhom1 человека. Последовательность iRhom1 человека раскрыта в настоящем документе как SEQ ID NO 50.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, которая кодирует по меньшей мере одну цепь связывающего агента согласно описанию выше.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте или паре нуклеиновых кислот, которая кодирует тяжелую цепь и легкую цепь, соответственно, связывающего агента, в случае, если последний представляет собой моноклональное антитело, имеющее гетеромерную структуру из по меньшей мере одной легкой цепи и одной тяжелой цепи.

Такую нуклеиновую кислоту также можно применять в фармацевтических целях. Нуклеиновая кислота может представлять собой молекулу РНК или производное РНК, содержащее, например, модифицированные нуклеотиды, такие как псевдоуридин (Ψ) или N-1-метилпсевдоуридин (m1Ψ), для обеспечения стабильности и снижения иммуногенности (см., например, US 8278036 и US 9428535, содержание которых включено в настоящий документ в поддерживающих целях). Согласно другому варианту осуществления РНК содержит наиболее богатый GC кодон, выбранный для обеспечения стабильности и снижения иммуногенности (см., например, EP1392341, содержание которого включено в настоящий документ в поддерживающих целях). мРНК, например, может быть доставлена в подходящих липосомах и содержит либо определенные последовательности, либо модифицированные нуклеозиды уридина, чтобы избежать иммунных ответов и/или улучшить эффективность укладки и трансляции, иногда включая модификации кэпа на 5'- и/или 3'-концах для нацеливания на определенные типы клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления соответствующие последовательности РНК выбраны из SEQ ID NO 100 – SEQ ID NO 147. См. таблицу ниже с целью обнаружения какая РНК кодирует какую последовательность антитела.

Нуклеиновая кислота также может представлять собой молекулу ДНК. В таком случае молекула может представлять собой кДНК, которая необязательно интегрирована в подходящий вектор, например, аттенуированный непатогенный вирус, или представлена в

виде одной или нескольких плазмид. Такие плазмиды можно, например, вводить пациенту с помощью устройства для электропорации, как, например, раскрыто в патенте EP 3397337B1, содержание которого включено в настоящий документ в поддерживающих целях. Согласно некоторым вариантам осуществления соответствующие последовательности ДНК выбраны из SEQ ID NO 52 – SEQ ID NO 99. См. таблицу ниже с целью обнаружения какая кДНК кодирует какую последовательность антитела.

В общем, из-за вырожденности генетического кода существует большое количество различных нуклеиновых кислот, способных кодировать такую цепь. Специалист в данной области способен определить, удовлетворяет ли данная нуклеиновая кислота вышеуказанному критерию. С другой стороны, специалист в данной области способен реконструировать из данной аминокислотной последовательности на основе таблиц использования кодонов подходящую нуклеиновую кислоту, кодирующую ее. Для этой цели можно использовать инструменты программного обеспечения, такие как «reverse translate», предоставляемый онлайн-инструментом «sequence manipulation suite» (https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html). Следовательно, существует множество альтернативных последовательностей ДНК и РНК, которые кодируют заявленные белковые последовательности. Эти альтернативные последовательности должны рассматриваться как подпадающие под объем настоящего изобретения.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к применению антитела или фрагмента или нуклеиновой кислоты согласно описанию выше (для получения лекарственного средства) для лечения субъекта человека или животного

- которому поставлен диагноз,
- который страдает от
- который имеет риск развития

воспалительного состояния, или для профилактики такого состояния.

Для того, чтобы диагностировать воспалительное состояние, пациент может пройти медицинский осмотр, а также может быть опрошен по вопросу анамнеза. Практикующий врач может провести исследование в отношении воспаления в суставах, тугоподвижности суставов и потери функции в суставе. Кроме того, практикующий врач может назначить рентген и/или анализы крови для выявления воспалительных маркеров, таких как, например, сывороточный hs-CRP, IL-6, TNF- α и IL-10, скорость оседания эритроцитов, вязкость плазмы, фибриноген и/или ферритин по сравнению со здоровым контролем.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или фрагмент или нуклеиновую кислоту согласно

описанию выше и необязательно одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к комбинации, содержащей (i) антитело или фрагмент, или нуклеиновую кислоту, или фармацевтическую композицию согласно описанию выше и (ii) одно или несколько терапевтически активных соединений.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики воспалительного состояния, причем способ предусматривает введение субъекту человеку или животному (i) антитела или фрагмента согласно описанию выше, (ii) нуклеиновой кислоты согласно описанию выше, (iii) фармацевтической композиции согласно описанию выше или (iv) комбинации согласно описанию выше в терапевтически достаточной дозе.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к терапевтическому набору из частей, содержащему:

- a) антитело или фрагмент согласно описанию выше, нуклеиновую кислоту согласно описанию выше, фармацевтическую композицию согласно описанию выше или комбинацию согласно описанию выше,
- b) устройство для введения композиции, композиции или комбинации и
- c) инструкции по применению.

Примеры

Хотя изобретение проиллюстрировано и подробно описано на чертежах и в предшествующем описании, такие иллюстрации и описание следует рассматривать как иллюстративные или примерные, а не ограничивающие, настоящее изобретение не ограничено раскрытыми вариантами осуществления. Другие варианты раскрытых вариантов осуществления могут быть понятны и реализованы специалистами в данной области техники при практическом применении заявленного изобретения на основе чертежей, раскрытия и прилагаемой формулы изобретения. В формуле изобретения слово «содержащий» не исключает другие элементы или стадии, а форма единственного числа не исключает множественное число. Тот факт, что определенные признаки указаны во взаимно различных зависимых пунктах формулы изобретения, не означает, что комбинация этих признаков не может быть использована с пользой. Любые ссылочные позиции в формуле изобретения не следует рассматривать как ограничивающие объем.

Все раскрытые в настоящем документе аминокислотные последовательности показаны от N-конца к C-концу, все раскрытые в настоящем документе последовательности нуклеиновых кислот показаны в направлении 5'→3'.

Общие способы гуманизации антител

Гуманизация путем прививки CDR представляет собой проверенный и успешный метод получения антител, происходящих из мышиных, других ксеногенных видов или гибридом, и снижения потенциальной иммуногенности при сохранении связывающей и функциональной активности родительского антитела. Обычно, начиная с химерного антитела, задача состоит в удалении чужеродных каркасных областей (FR) в переменных доменах, которые могут вызывать иммунный ответ. Решение задачи состоит в «прививке» определяющих комплементарность областей (CDR) мышиного антитела на человеческий акцепторный каркас.

Однако прививка CDR сама по себе может привести к значительному снижению или полной потере аффинности связывания, поскольку набор поддерживающих каркасных остатков в вернейной зоне важен для поддержания конформации CDR. Эта проблема может быть решена путем повторного введения мышиных остатков в каркас человека, такие замены обычно называют обратными мутациями.

Поскольку наиболее важным свойством терапевтического антитела является активность, важно, чтобы замены, предлагаемые в ходе гуманизации, не влияли на аффинность или стабильность антитела. За последние 20 лет было собрано большое количество информации о гуманизации и прививке CDR, биофизических свойствах антител, конформации петель CDR и каркасах, которые наряду с прогрессом в моделировании белков позволяют точно гуманизировать антитела с сохранением аффинности связывания и стабильности.

Процедуру гуманизации проводили, как описано ниже:

- 1) Идентифицировали домены и области родительского антитела.
- 2) Идентифицировали критические положения и потенциальные посттрансляционные модификации (PTM).

Антитела Fv имеют ряд критических положений, которые составляют межцепочечное взаимодействие VH/VL или отвечают за дискретный набор канонических структур, который был определен для 5 из CDR: эти положения должны быть подробно рассмотрены до того, как будут предложены замены для них.

Посттрансляционные модификации (PTM) могут вызвать проблемы в ходе разработки терапевтического белка, такие как повышенная гетерогенность, снижение

биологической активности, снижение стабильности, иммуногенность, фрагментация и агрегация. Потенциальное влияние РТМ зависит от их местонахождения и, в некоторых случаях, от воздействия растворителей. Последовательности анализировали на следующие потенциальные РТМ: дезамидирование аспарагина, изомеризация аспартата, свободная тиоловая группа цистеина, N-гликозилирование, окисление метионина и триптофана.

3) На основе анализа последовательностей и критических положений выбирали оптимальные акцепторные последовательности зародышевой линии человека для каждой цепи.

На основе выравнивания последовательности родительского антитела с зародышевыми линиями человека идентифицировали наиболее близкие совпадающие последовательности. Идентификация оптимальных человеческих зародышевых линий в качестве акцептора основана на упорядоченных критериях, перечисленных ниже:

- Идентичность последовательности по всему гену V (каркас + CDR)
- Идентичные или совместимые остатки межцепочечного интерфейса
- Поддерживающие петли с каноническими конформациями родительских CDR

4) Строили трехмерную структурную модель родительских мышинных Fv-областей.

5) После тщательного изучения молекулярной модели проводили первоначальную оценку возможности замены каждого положения. Положения классифицировали как нейтральные или критические. Также идентифицировали единичные мутации для нарушения потенциальных РТМ.

6) Прививку CDR выполняли путем анализа положений, различающихся между родительской и акцепторной последовательностями. Все замены в нейтральных положениях проводили.

Для фазы конструирования гуманизованного антитела процедура более точно определяется как зародышевая линия — замена аминокислот в родительском каркасе, которые отличаются от выбранного акцептора соответствующей человеческой аминокислотой.

7) Комбинации различных гуманизованных вариантов VH и VL получали, очищали и тестировали на связывание и биологическую активность.

8) Отбор наилучшей гуманизованной комбинации тяжелых и легких цепей между различными вариантами осуществляли путем оценки следующих критериев:

а) Уровень транзientной экспрессии гуманизованных вариантов, продуцируемых в клетках млекопитающих (НЕК 293 или предпочтительно CHO), в виде

человеческого IgG1/каппа (по сравнению с химерным вариантом). Применение супернатанта тканевой культуры из трансфицированных клеток перед сбором для очистки с помощью ELISA или измерения с помощью белка А с использованием систем обнаружения без меток Octet.

b) Связывающая способность (EC50 по данным ELISA или FACS, или предпочтительно Kd согласно Biacore или Octet) по сравнению с химерным вариантом человеческого IgG1/каппа (химерный означает комбинацию родительских мышиных VH и VL, слитых с константными областями человека).

c) Биологическую активность гуманизированных вариантов в соответствующем клеточном анализе *in vitro* сравнивали с активностью эталонного химерного антитела.

d) Перекрестная реактивность с соответствующими видами-ортологами (связывающая активность *in vitro*).

e) Определение биофизических свойств гуманизированных вариантов по сравнению с химерными:

- профиль SEC-HPLC для определения уровня высокомолекулярных агрегатов,
- SDS-PAGE в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях,
- Анализ методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) с использованием капиллярной системы DSC Microcal™ VP для определения Tm Fab, CH2 и CH3.

Общие способы получения антител

Для получения материала рекомбинантного антитела разработали, оптимизировали и синтезировали целевую последовательность ДНК. Полную последовательность субклонировали в вектор экспрессии, и плазмиду степени трансфекции максипрепарировали для экспрессии в клетках CHO. Клетки CHO выращивали в экспрессионной среде CHO TF (Xell AG, Germany) и трансфицировали рекомбинантными плазмидами, кодирующими целевой белок. Супернатант клеточной культуры, собранный в день 11 после трансфекции, использовали для очистки. Культуральный бульон центрифугировали и фильтровали. Отфильтрованный супернатант клеточной культуры загружали на колонки для аффинной очистки MabSelect PrismA (Thermo Fisher, USA) при соответствующей скорости потока. После промывки и элюирования соответствующими буферами элюированные фракции объединяли, а буфер заменяли на буфер окончательного состава.

Очищенный белок анализировали с помощью SDS-PAGE для измерения молекулярной массы и чистоты.

Пример 1. Определение аффинности гуманизированных антител согласно настоящему изобретению

В этом исследовании выполняли измерения аффинности гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению посредством непрямого анализа FACS Скэтчарда на клетках L920-2041-hiR2-FL-WT-T7, мышины клеточной линии, экспрессирующей iRhom2 человека.

Создание L929-2041-hiR2-FL-WT-T7

Для создания клеточной системы, подходящей для сопоставимого и надежного анализа связывания антител, мышинные фибробласты L929 (NCTC клон 929) (ATCC, USA) генетически модифицировали с нокаутом мышинового гена iRhom2. Полученную мышиную клеточную линию L929 с нокаутом iRhom2 затем инфицировали различными конструкциями iRhom2 человека для получения производных клеточной линии, стабильно экспрессирующих различные белки iRhom2 человека, что позволяет проводить анализ связывания с различными вариантами iRhom2 на одном и том же генетическом фоне.

Кратко, гРНК mRhbdf2.3 IVT (AAGCATGCTATTCCTGCTCGC) синтезирована компанией Thermo Fisher Scientific GeneArt GmbH, Regensburg, Germany. Через один день после посева в 24-луночные планшеты родительские клетки L929 трансфицировали согласно Руководству GeneArt CRISPR Nuclease mRNA (Thermo Fisher Scientific, USA) смесью гРНК/GeneArt Platinum Cas9 нуклеаза (Thermo Fisher Scientific, USA) с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine CRISPRMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA). Через 3 дня после трансфекции клетки лизировали и выделяли ДНК для амплификации специфических продуктов ПЦР с использованием пары праймеров mRhbdf2.3 fwd (TCAATGAGCTCTTTATGGGGCA) / mRhbdf2.3 rev (AAGGTCTCCATCCCCTCAGGTC) (Thermo Fisher Scientific, USA). Для отбора положительных лунок GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) добавляли к тем образцам, которые имели заметную одиночную полосу правильного размера в агарозном геле (Thermo Fisher Scientific, USA). Анализ расщепления продуктов ПЦР также проводили на агарозных гелях Invitrogen 2% E-Gel Size Select. Проводили два раунда последующего субклонирования идентифицированной поликлональной популяции L929 с использованием метода ограниченных разведений с использованием набора для обнаружения расщепления для идентификации положительных субклонов. Таким образом,

наиболее многообещающий положительный субклон, идентифицированный в первом раунде, названный 1029, дополнительно субклонировали во втором раунде с получением окончательного клона, названного 2041. Популяцию моноклональных клеток, полученная из этого субклона, назвали L929-2041 и использовали для последующего инфицирования (в соответствии с процедурой, описанной в примере 3) конструкцией iRhom2 человека hiR2-FL-WT-T7 с получением клеточных линий L929-2041-hiR2-FL-WT-T7.

Анализы FACS Скэтчарда на L929-2041-hiR2-FL-T7

Кратко, L929-2041-hiR2-FL-T7 собирали с 10 mM EDTA в PBS, промывали и ресуспендировали в буфере FACS (PBS, 3% FBS, 0,05% азида натрия) и высевали в 96-луночные планшеты Nunc с U-образным дном (Thermo Fisher Scientific, USA) приблизительно по 3×10^5 клеток на лунку. Для осаждения клеток и удаления супернатантов планшеты центрифугировали при 1500 оборотах в минуту и 4 °C в течение 3 минут. Для первичного окрашивания клетки ресуспендировали в 100 мкл на лунку либо только FACS-буфера (контроль), либо серийных двукратных разведений (всего 22 концентрации) гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению в FACS буфере, начиная с 160 мкг/мл, и инкубировали на льду в течение 1 часа. После этого планшеты центрифугировали при 1500 оборотах в минуту и 4 °C в течение 3 минут и дважды промывали по 200 мкл на лунку буфером FACS. Для вторичного окрашивания клетки центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл на лунку фрагмента обнаружения PE-конъюгированного козьего анти-человеческий IgG F(ab')₂ (Dianova, Germany), разведенного 1:100 в буфере FACS. Защищенные от света клеточные суспензии инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшеты центрифугировали при 1500 оборотах в минуту и 4 °C в течение 3 минут и трижды промывали 200 мкл на лунку буфера FACS. Наконец, клетки ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS на лунку и анализировали с помощью проточного цитометра BD Accuri™ C6 Plus (Becton Dickinson, Germany). Применяя программное обеспечение Prism8 (GraphPad Software, USA), вычисляли соответствующее значение KD для каждого из антител согласно настоящему изобретению.

На фиг. 1 показаны репрезентативные результаты этого исследования, демонстрирующие, что значения KD для связывания гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению с клетками L929-2041-hiR2-FL-T7 находятся в диапазоне от субнанолярного до низкого нанолярного.

Пример 2. Создание мышинных эмбриональных фибробластов с двойным нокаутом *iRhom1/2-/-*

Для различных целей, в частности исследований связывания, описанных в некоторых из следующих примеров, требовались клеточные системы, экспрессирующие определенные уровни конкретных представляющих интерес вариантов *iRhom* на фоне отсутствия какого-либо эндогенного белка *iRhom1* или *iRhom2*. Для этой цели создавали мышинные эмбриональные фибробласты (MEF) от мышей с двойным нокаутом (DKO), гомозиготны отрицательных как по мышинному *iRhom1*, так и по мышинному *iRhom2* (*iRhom1/2-/-*). В этом примере описаны мышинные линии, использованные для создания *iRhom1/2-/-* DKO MEF и получения иммортализованной клеточной линии *iRhom1/2-/-* DKO MEF.

Мышинные линии, используемые для создания *iRhom1/2-/-* DKO MEF

Кратко, мышинную линию *Rhbdf2tm1b(KOMP)Wtsi* на основе C57BL/6N (C57BL/6N-*Rhbdf2tm1b(KOMP)Wtsi*) получали из репозитория Knockout Mouse Project (КОМП) Калифорнийского университета в Дэвисе, США (*Rhbdf2* является альтернативным названием для *iRhom2*). Гетерозиготных самцов мышей *Rhbdf2tm1b* скрещивали с самками мышей дикого типа генетического фона 129Sv/J с получением гетерозиготного потомства смешанного генетического фона (129Sv/J-C57BL/6N). Этих гетерозиготных мышей скрещивали друг с другом с получением потомства мужского и женского пола, гомозиготного по делеции гена *Rhbdf2* (мыши *Rhbdf2-/-*, 129Sv/J-C57BL/6N). Полученную колонию гомозиготных мышей с нокаутом *Rhbdf2* дополнительно разводили скрещиванием самцов *Rhbdf -/-* и самок мышей с получением достаточного количества мышей. Гомозиготные мыши *Rhbdf2-/-* были жизнеспособны и фертильны без явных спонтанных патологических фенотипов.

Мышей с нокаутом *Rhbdf1* получали в рамках Европейской программы условного мутагенеза мышей (EUCOMM) Международного консорциума мышей мышь с нокаутированным геном (ИКМС). Создание этих животных описано в Li et al., PNAS, 2015, doi: 10.1073/pnas.1505649112. Гомозиготные мыши *Rhbdf1-/-* были жизнеспособны и фертильны без явных спонтанных патологических фенотипов.

Для получения мышей DKO для *Rhbdf1* и *Rhbdf2* (мыши *Rhbdf1/2-/-*) мышей *Rhbdf1-/-* скрещивали с мышами *Rhbdf2-/-* с получением *Rhbdf1+/-Rhbdf2+/-* дважды гетерозиготных мышей. Их скрещивали с мышами *Rhbdf2-/-* с получением животных *Rhbdf1+/-Rhbdf2-/-*, которых скрещивали друг с другом с получением эмбрионов E14.5, лишенных обоих генов *Rhbdf* (эмбрионы *Rhbdf1/2-/-* DKO) при ожидаемом менделевском

отношении (1/4 всех эмбрионов) для продукции E13.5 Rhbdf1/2-/- DKO MEF, как описано ниже.

Создание иммортализованной клеточной линии iRhom1/2-/- DKO MEF

Кратко, беременных самок Rhbdf1+/-Rhbdf2-/- умерщвляли при E13.5. Рога матки удаляли в чашку с ледяным PBS. С помощью тонкоконечных щипцов эмбрионы освобождали от материнской ткани и каждый эмбрион удаляли из плаценты. Затем каждый эмбрион обезглавливали острым скальпелем и удаляли все внутренние органы, такие как печень, сердце, легкие и кишечник. Участок хвоста толщиной 0,5 мм удаляли и переносили в пробирку Эппендорфа на 1,5 мл для выделения геномной ДНК и последующего генотипирования методом ПЦР для подтверждения правильного генотипа эмбриона. После этого оставшуюся эмбриональную ткань промывали PBS один раз и переносили в чашку для культивирования тканей с 2 мл 0,25% трипсина/EDTA. Ткань тщательно измельчали двумя стерильными скальпелями, и смесь трипсин/клетки инкубировали при 37°C в течение 15 минут. Трипсинизацию останавливали добавлением питательной среды, содержащей FCS. Для того, чтобы получить суспензию отдельных клеток, смесь пипетировали вверх и вниз, сначала пять раз с помощью пипетки для сыворотки на 10 мл, затем пять раз с помощью пипетки для сыворотки на 5 мл и, наконец, несколько раз с помощью пипетки Пастера, отполированной огнем, для дальнейшей диссоциации любых оставшихся клеточных кластеров. Затем клетки, полученные из одного эмбриона, высевали на две 10-сантиметровые чашки для тканевых культур. На следующий день среду заменяли свежей средой и позволяли клеткам расти до тех пор, пока они не достигали 90% слияния. Наконец, клетки размножали и хранили для будущего использования.

Для иммортализации первичных Rhbdf1/2-/-DKO MEF клетки трансдуцировали ретровирусной системой с использованием системы экспрессии рMSCV (Clontech, USA). Кратко, рMSCV-Zeo-SV40 создавали следующим образом: последовательности, кодирующие устойчивость к пурамицину, удаляли из плазмиды рMSCV-puro (Clontech, USA) и заменяли последовательностями, придающими устойчивость к зеоцину, из вектора рсDNA3.1(+)-Zeo (Thermo Fisher Scientific, USA). Ретровирусную пакующую клеточную линию GP2-293 (Clontech, USA) использовали в комбинации с оболочечным вектором рVSV-G (Clontech, USA) и плазмидой рMSCV-Zeo-SV40 для получения ретровируса, кодирующего большой Т-антиген SV40. Вирус отфильтровывали и добавляли к первичным Rhbdf1/2-/- DKO MEF, высеянными при 50% слиянии, на 24 часа. Затем трансдуцированным Rhbdf1/2-/- DKO MEF позволяли расти в питательной среде без селективного давления в течение 24 часов, а затем переносили в питательную среду, содержащую 100 мкг/мл

зеоцина. Клетки пассировали при слиянии и после десяти пассажей сохраняли для последующего использования.

Пример 3. Оценка мышинной перекрестной реактивности гуманизированных антител согласно настоящему изобретению

Затем иммортализованные iRhom1/2-/- DKO MEF восстанавливали с помощью меченой формы iRhom2 человека для тестирования распознавания мишени гуманизированных антител согласно настоящему изобретению. Кроме того, создавали iRhom1/2-/- DKO MEF, стабильно экспрессирующие меченую форму мышинового iRhom2, для определения перекрестной реактивности гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению с мышинным ортологом iRhom2.

Создание iRhom1/2-/- DKO MEF, стабильно экспрессирующих T7-меченый человеческий или мышинный iRhom2

Кратко, в день 1 клетки Phoenix-ECO (Американская коллекция типовых культур, USA) высевали на 6-луночные планшеты для тканевых культур (Greiner, Germany) в стандартной питательной среде при 8×10^5 клеток на лунку и оставляли на ночь при 37°C, 5 % CO₂. В день 2 среду заменяли свежей средой с добавлением хлорохина (Sigma-Aldrich, USA) в конечной концентрации 25 мкМ. Применяя кальций-фосфатный метод, клетки трансфицировали с 2 мкг/мл пустого вектора pMSCV (Clontech, USA), pMSCV-hiR2-FL-WT-T7, кодирующего полноразмерный iRhom2 человека дикого типа, помеченный на С-конце 3 последовательными копиями эпитопа T7 (MASMTGGQQMG), или pMSCV-miR2-FL-WT-T7, кодирующий полноразмерный мышинный iRhom2 дикого типа, помеченный на С-конце 3 последовательными копиями эпитопа T7, и хранили при 37°C, 5 % CO₂. Через 7 часов трансфекции останавливали путем замены клеточных супернатантов стандартной питательной средой без хлорохина, и клетки инкубировали при 37 °C, 5% CO₂ с обеспечением продукции вируса в течение ночи. Параллельно иммортализованные iRhom1/2-/- DKO MEF в качестве клеток-мишеней для ретровирусной инфекции высевали на 6-луночные планшеты для тканевых культур (Greiner, Germany) в стандартной питательной среде в количестве 1×10^5 клеток на лунку и также оставляли на ночь при 37 °C, 5% CO₂. В день 3 супернатанты клеток Phoenix-ECO, высвобождающих экотропный вирус pMSCV, pMSCV-hiR2-FL-WT-T7 или pMSCV-miR2-FL-WT-T7, собирали, фильтровали с помощью фильтров CA 0,45 мкм и добавляли 4 мкг /мл полибрена (Sigma-Aldrich, USA). После удаления среды из иммортализованных iRhom1/2-/- DKO MEF

супернатанты, содержащие вирус, добавляли к клеткам-мишеням на 4 часа при 37°C, 5 % CO₂ для первого заражения. Одновременно клетки Phoenix-ECO повторно инкубировали со свежей средой, которую еще через 4 часа фильтровали и использовали для повторного заражения соответствующих популяций клеток-мишеней, снова в присутствии 4 мкг/мл полибрена. Подобным образом проводили третий, но ночной цикл заражения. В день 4 супернатанты клеток, содержащие вирус, заменяли свежей стандартной питательной средой. Начиная с дня 5 клетки выращивали в присутствии 2 мг/мл генетицина (G418, Thermo Fisher Scientific, USA) для отбора иммортализованных контрольных клеток MEF-DKO-EV, стабильно инфицированных пустым вектором pMSCV, клеток MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7, стабильно экспрессирующих полноразмерный iRhom2 человека дикого типа, помеченные на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа T7, и клеток MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7, стабильно экспрессирующих мышинный полноразмерный iRhom2 дикого типа, помеченный на С-конце 3 последовательными копиями эпитопа T7. После размножения клетки хранили для последующего использования.

Анализы FACS для валидации систем тестирования и определения характеристик антител

Кратко, иммортализованные контрольные клетки MEF-DKO-EV, клетки MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7 и клетки MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7 собирали с 10 mM EDTA в PBS, промывали и ресуспендировали в буфере FACS (PBS, 3% FBS, 0,05% азид натрия) и высевали в 96-луночные планшеты Nunc с U-образным дном (Thermo Fisher Scientific, USA) приблизительно по 3×10^5 клеток на лунку. Для осаждения клеток и удаления супернатантов планшеты центрифугировали при 1500 оборотах в минуту и 4 °C в течение 3 минут. Для первичного окрашивания клетки ресуспендировали в 100 мкл на лунку либо только в буфере FACS (контроль), либо мышинового моноклонального анти-T7 IgG (Merck Millipore, USA) в концентрации 3 мкг/мл буфера FACS, либо гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению, также при 3 мкг/мл буфера FACS, и инкубировали на льду в течение 1 часа. После этого планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4 °C в течение 3 минут и дважды промывали по 200 мкл на лунку буфера FACS. Для вторичного окрашивания предыдущего окрашивания анти-T7 клетки центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл на лунку фрагмента обнаружения PE-конъюгированного козьего анти-мышинного IgG F(ab')₂ (Dianova, Germany), разбавленного 1:100 в буфере FACS. Для вторичного окрашивания предыдущего окрашивания анти-T7 клетки центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл на лунку фрагмента обнаружения PE-конъюгированного козьего анти-человеческий

IgG F(ab')₂ (Dianova, Germany), разбавленного 1:100 в буфере FACS. Защищенные от света клеточные суспензии инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4 °C в течение 3 минут и трижды промывали 200 мкл на лунку буфера FACS. Наконец, клетки ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS на лунку и анализировали с помощью проточного цитометра BD Accuri™ C6 Plus (Becton Dickinson, Germany).

На фиг. 2a и 2b показаны репрезентативные результаты этого эксперимента. По сравнению с контрольными образцами, инкубированными только с анти-мышиный IgG или анти-человеческий IgG вторичным антителом (2a и 2b, серый), совместная инкубация с анти-T7 меченым антителом (фиг. 2a, черный) приводит к очень небольшому фоновому окрашиванию контрольных клеток MEF-DKO-EV (фиг. 2a, слева). Напротив, анализ связывания анти-T7 меченных антител как на клетках MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7 (фиг. 2a, в центре), так и на клетках MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7 (фиг. 2a, справа) выявил сильное увеличение относительной интенсивности флуоресценции, демонстрируя локализацию как эктопически экспрессированного человеческого, так и мышинового варианта iRhom2 на поверхности этих генетически сконструированных клеточных популяций и, таким образом, подтвердил их пригодность в качестве систем тестирования для определения характеристик антител согласно настоящему изобретению. Совместная инкубация этих клеточных популяций с гуманизированным антителом 16-B-03 в качестве иллюстративного примера гуманизированных антител согласно настоящему изобретению (фиг. 2b, черный) не приводит к фоновому окрашиванию контрольных клеток MEF-DKO-EV (фиг. 2b, слева), в то время как сильный сдвиг относительной интенсивности флуоресценции, аналогичный сдвигу, наблюдаемому с анти-T7 меченым антителом, на клетках MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7 демонстрирует сильное связывание гуманизированного антитела 16-B-03 согласно настоящему изобретению с клетками MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7 (фиг. 2b, справа), что свидетельствует о том, что мышиный вариант iRhom2, присутствие которого на клеточной поверхности подтверждается анти-T7 меченым антителом (фиг. 2a, справа), не распознается гуманизированным антителом 16-B-03 согласно настоящему изобретению. Подобные результаты были получены с гуманизированными антителами 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02, 42-B-04 согласно настоящему изобретению, демонстрируя, что ни одно из этих гуманизированных антител согласно настоящему изобретению не является перекрестно реагирующим с мышинным iRhom2.

Пример 4. Оценка специфичности связывания гуманизированных антител согласно настоящему изобретению

Из-за гомологии последовательностей белка iRhom2 человека по сравнению с близкородственным членом семейства iRhom1 человека (ссылаясь на эталонную последовательность NCBI NP_078875.4. для iRhom2 человека и эталонную последовательность NCBI NP_071895.3 для iRhom1 человека, идентичность аминокислотной последовательности для внеклеточных петель 1, 2, 3 и С-концевого хвоста iRhom2 человека по сравнению с iRhom1 человека вычислены как 67,4 %, 100,00 %, 80,00 % и 63,64 %, соответственно), специфичность связывания гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02, 42-B-04 согласно настоящему изобретению для iRhom2 человека по сравнению с iRhom1 человека оценивали на следующей стадии. Для этой цели создавали iRhom1/2-/-DKO MEF, стабильно экспрессирующие меченую форму iRhom1 человека.

Создание iRhom1/2-/- DKO MEF, стабильно экспрессирующих T7-меченный iRhom1 человека

Кратко, в день 1 клетки Phoenix-ECO (Американская коллекция типовых культур, USA) высевали на 6-луночные планшеты для тканевых культур (Greiner, Germany) в стандартной питательной среде при 8×10^5 клеток на лунку и хранили всю ночь при 37°C, 5 % CO₂. В день 2 среду заменяли на свежую среду с добавлением хлорохина (Sigma-Aldrich, USA) при конечной концентрации 25 мкМ. Применяя способ на основе фосфата кальция, клетки трансфецировали с 2 мкг/мл pMSCV-hiR1-FL-WT-T7 (SEQ ID NO 50), кодирующих полноразмерный iRhom1 человека дикого типа, меченный на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа T7, и хранили при 37°C, 5 % CO₂. Через 7 часов трансфекции останавливали путем замены клеточных супернатантов стандартной питательной средой без хлорохина, и клетки инкубировали при 37°C, 5 % CO₂ с обеспечением продукции вируса в течение всей ночи. Параллельным образом, иммортализованные iRhom1/2-/- DKO MEF в качестве клеток-мишеней для ретровирусного заражения высевали на 6-луночные планшеты для тканевых культур (Greiner, Germany) в стандартной питательной среде при 1×10^5 клеток на лунку и также хранили всю ночь при 37°C, 5 % CO₂. В день 3, супернатанты клеток Phoenix-ECO, высвобождающие экотропный вирус pMSCV-hiR1-FL-WT-T7, собирали, фильтровали с помощью СА-фильтров 0,45 мкм и добавляли 4 мкг/мл полибрена (Sigma-Aldrich, USA). После удаления среды из иммортализованных iRhom1/2-/- DKO MEF, эти супернатанты добавляли к клеткам-мишеням на 4 часа при 37°C, 5 % CO₂ для первого заражения. Одновременно клетки

Phoenix-ЕСО повторно инкубировали со свежей средой, которую еще через 4 часа фильтровали и использовали для повторного заражения соответствующих популяций клеток-мишеней, опять же в присутствии 4 мкг/мл полибрена. Подобным образом проводили третий, но ночной цикл заражения. В день 4, супернатанты клеток, содержащие вирус, заменяли свежей стандартной питательной средой. Начиная с дня 5 клетки выращивали в присутствии 2 мг/мл генетицина (G418, Thermo Fisher Scientific, USA) для отбора immortalized клеток MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7, стабильно экспрессирующих полноразмерный iRhom1 человека дикого типа, меченный на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа Т7. После размножения клетки хранили для будущего использования.

Анализ FACS для валидации систем тестирования и определения характеристик антител

Кратко, в дополнение к immortalized контрольным клеткам MEF-DKO-EV и клеткам MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7 (как уже описано в примере 3), клетки MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7 собирали с 10 mM EDTA в PBS, промывали и ресуспендировали в буфере FACS (PBS, 3 % FBS, 0,05 % азида натрия), и высевали в 96-луночные планшеты Nunc с U-образным дном (Thermo Fisher Scientific, USA) при приблизительно 3×10^5 клеток на лунку. Для осаждения клеток и удаления супернатантов планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут. Для первичного окрашивания клетки ресуспендировали в 100 мкл на лунку либо только в буфере FACS (контроли), мышиного моноклонального анти-Т7 IgG (Merck Millipore, USA) при 3 мкг/мл буфера FACS, либо гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02, 42-B-04 согласно настоящему изобретению также при 3 мкг/мл буфера FACS, и инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут и промывали дважды с 200 мкл на лунку буфера FACS. Для вторичного окрашивания анти-Т7 окрашивания, клетки центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл на лунку фрагмента обнаружения PE-конъюгированного козьего анти-мышинного IgG F(ab')₂ (Dianova, Germany), разведенного 1:100 в буфере FACS. Для вторичного окрашивания предыдущего окрашивания гуманизированными антителами согласно настоящему изобретению, клетки центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл на лунку фрагмента обнаружения PE-конъюгированного козьего анти-человеческий IgG F(ab')₂ (Dianova, Germany), разведенного 1:100 в буфере FACS. Защищенные от света клеточные суспензии инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут и промывали три

раза с 200 мкл на лунку буфера FACS. Наконец, клетки ресуспендировали в 150 мкл на лунку буфера FACS и анализировали с помощью проточного цитометра BD Accuri™ C6 Plus (Becton Dickinson, Germany).

На фиг. 3а и 3b показаны репрезентативные результаты этих анализов. По сравнению с окрашиванием контрольных клеток MEF-DKO-EV (фиг. 3а, слева, идентично фиг. 2а, слева) и MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7 (фиг. 3а, справа, идентично фиг. 2а, в центре), сильное увеличение относительной интенсивности флуоресценции, полученное на MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7 с анти-T7 меченным антителом (фиг. 3а, в центре), демонстрирует, что, подобно варианту iRhom2 человека, вариант iRhom1 человека также локализован на поверхности этой генетически сконструированной клеточной популяции и, таким образом, подтверждает ее пригодность в качестве системы тестирования для определения характеристик антител согласно настоящему изобретению. В этом контексте при связывании антитела 16-B-03 в качестве иллюстративного примера гуманизированных антител согласно настоящему изобретению с человеческим вариантом iRhom2, экспрессируемым на клетках MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7 (фиг. 3b, справа; идентично фиг. 2b, в центре), как уже было показано в примере 3, не обнаруживается значительного связывания гуманизированного антитела 16-B-03 согласно настоящему изобретению с клетками MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7 (фиг. 3b, в середине), что является доказательством того, что вариант iRhom1 человека, присутствие которого на клеточной поверхности подтверждается анти-T7 меченным антителом (фиг. 3а, в центре), не распознается гуманизированным антителом 16-B-03 согласно настоящему изобретению. Аналогичные результаты были получены с гуманизированными антителами 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02, 42-B-04 согласно настоящему изобретению, демонстрируя, что ни одно из этих гуманизированных антител согласно настоящему изобретению не распознает iRhom1 человека.

Пример 5. Оценка перекрестной реактивности антител согласно настоящему изобретению с различными видами

Затем создавали iRhom1/2-/- DKO MEF, стабильно экспрессирующие меченую форму iRhom2 макаки-резуса, яванского макака, собаки или кролика, для определения перекрестной реактивности антител согласно настоящему изобретению с соответствующим ортологом iRhom2. iRhom1/2-/- DKO MEF, стабильно экспрессирующие меченую форму iRhom1 макаки-резуса, яванского макака, собаки или кролика, создавали для подтверждения специфичности в отношении iRhom2 по сравнению с iRhom1 этих видов.

Создание iRhom1/2-/- DKO MEF, стабильно экспрессирующих T7-меченный iRhom2 макак-резусов, яванских макак, собак или кроликов

Кратко, в день 1 клетки Phoenix-ECO (Американская коллекция типовых культур, USA) высевали на 6-луночные планшеты для тканевых культур (Greiner, Germany) в стандартной питательной среде при 8×10^5 клеток на лунку и хранили всю ночь при 37°C , 5 % CO_2 . В день 2 среду заменяли на свежую среду с добавлением хлорохина (Sigma-Aldrich, USA) при конечной концентрации 25 мкМ. Применяя способ на основе фосфата кальция, клетки трансфецировали с 2 мкг/мл пустого вектора pMSCV (Clontech, USA), pMSCV-rhesus-iR2-FL-WT-T7, кодирующего полноразмерный iRhom2 макаки-резус дикого типа, меченный на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа T7, pMSCV-cyno-iR2-FL-WT-T7, кодирующего полноразмерный iRhom2 яванских макак дикого типа, меченный на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа T7, pMSCV-dog-iR2-FL-WT-T7, кодирующего полноразмерный iRhom2 собак дикого типа, меченный на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа T7, или pMSCV-rabbit-iR2-FL-WT-T7, кодирующего полноразмерный iRhom2 кролика дикого типа, меченный на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа T7, соответственно, и хранили при 37°C , 5 % CO_2 . Через 7 часов, трансфекции останавливали путем замены клеточных супернатантов стандартной питательной средой без хлорохина, и клетки инкубировали при 37°C , 5 % CO_2 с обеспечением продукции вируса в течение всей ночи. Параллельным образом, иммортализованные iRhom1/2-/- DKO MEF в качестве клеток-мишеней для ретровирусного заражения высевали на 6-луночные планшеты для тканевых культур (Greiner, Germany) в стандартной питательной среде при 1×10^5 клеток на лунку и также хранили всю ночь при 37°C , 5 % CO_2 . В день 3, супернатанты клеток Phoenix-ECO, высвобождающих экотропный вирус pMSCV, pMSCV-rhesus-iR2-FL-WT-T7, pMSCV-cyno-iR2-FL-WT-T7, pMSCV-dog-iR2-FL-WT-T7 или pMSCV-rabbit-iR2-FL-WT-T7, соответственно собирали, фильтровали с помощью СА-фильтров 0,45 мкм и добавляли 4 мкг/мл полибрена (Sigma-Aldrich, USA). После удаления среды из иммортализованных iRhom1/2-/- DKO MEF, супернатанты, содержащие вирус, добавляли к клеткам-мишеням на 4 часа при 37°C , 5 % CO_2 для первого заражения. Одновременно клетки Phoenix-ECO повторно инкубировали со свежей средой, которую еще через 4 часа фильтровали и использовали для повторного заражения соответствующих популяций клеток-мишеней, опять же в присутствии 4 мкг/мл полибрена. Подобным образом проводили третий, но ночной цикл заражения. В день 4, супернатанты клеток, содержащие вирус, заменяли свежей стандартной питательной средой. Начиная с дня 5 клетки выращивали в присутствии 2 мг/мл генетицина (G418, Thermo Fisher Scientific, USA) для отбора иммортализованных контрольных клеток MEF-DKO-EV, стабильно

инфицированных пустым вектором pMSCV, клеток pMSCV-rhesus-iR2-FL-WT-T7, стабильно экспрессирующих полноразмерный iRhom2 макак-резус дикого типа, меченный на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа T7, клеток pMSCV-cyno-iR2-FL-WT-T7, стабильно экспрессирующих полноразмерный iRhom2 яванских макак дикого типа, меченный на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа T7, клеток pMSCV-dog-iR2-FL-WT-T7, стабильно экспрессирующих полноразмерный iRhom2 собак дикого типа, меченный на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа T7, или клеток pMSCV-rabbit-iR2-FL-WT-T7, стабильно экспрессирующих полноразмерный iRhom2 кролика дикого типа, меченный на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа T7, соответственно. После размножения клетки хранили для будущего использования. Параллельным образом, iRhom1/2-/- DKO MEF, стабильно экспрессирующие меченую форму iRhom1 макаки-резуса, яванского макака, собаки или кролика.

Анализ FACS для валидации систем тестирования и определения характеристик антител

Кратко, иммортализованные контрольные клетки MEF-DKO-EV, клетки MEF-DKO-rhesus-iR2-FL-WT-T7, клетки MEF-DKO-cyno-iR2-FL-WT-T7, клетки MEF-DKO-dog-iR2-FL-WT-T7 и клетки MEF-DKO-rabbit-iR2-FL-WT-T7, а также их соответствующие партнеры iRhom1, собирали с 10 mM EDTA в PBS, промывали и ресуспендировали в буфере FACS (PBS, 3 % FBS, 0,05 % азида натрия), и высевали в 96-луночные планшеты Nunc с U-образным дном (Thermo Fisher Scientific, USA) при приблизительно 3×10^5 клеток на лунку. Для осаждения клеток и удаления супернатантов планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут. Для первичного окрашивания клетки ресуспендировали в 100 мкл на лунку либо только в буфере FACS (контроли), мышинового моноклонального анти-T7 IgG (Merck Millipore, USA) при 3 мкг/мл буфера FACS или антител согласно настоящему изобретению также при 3 мкг/мл буфера FACS и инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут и промывали дважды с 200 мкл на лунку буфера FACS. Для вторичного окрашивания анти-T7 окрашивания, клетки центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл на лунку фрагмента обнаружения PE-конъюгированного козьего анти-мышинового IgG F(ab')₂ (Dianova, Germany), разведенного 1:100 в буфере FACS. Для вторичного окрашивания предыдущего окрашивания гуманизированными антителами согласно настоящему изобретению, клетки центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл на лунку фрагмента обнаружения PE-конъюгированного козьего анти-человеческий IgG F(ab')₂ (Dianova, Germany), разведенного 1:100 в буфере

FACS. Защищенные от света клеточные суспензии инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут и промывали три раза с 200 мкл на лунку буфера FACS. Наконец, клетки ресуспендировали в 150 мкл на лунку буфера FACS и анализировали с помощью проточного цитометра BD Accuri™ C6 Plus (Becton Dickinson, Germany).

На фиг. 4а и 4b показаны репрезентативные результаты анализа перекрестной реактивности с макаками-резус. По сравнению с окрашиванием контрольных клеток MEF-DKO-EV (фиг. 4а, слева, идентично фиг. 2а, слева), MEF-DKO-Rhesus-iR1-FL-WT-T7 (фиг. 4а, в центре) и MEF-DKO-Rhesus-iR2-FL-WT-T7 (фиг. 4а, справа), сильное увеличение относительной интенсивности флуоресценции, полученное на MEF-DKO-Rhesus-iR1-FL-WT-T7 и MEF-DKO-Rhesus-iR2-FL-WT-T7 с анти-T7 меченым антителом, демонстрирует, что, подобно вариантам iRhom1 и 2 человека, варианты iRhom1 и 2 макаки-резус также локализованы на поверхности этой генетически сконструированной клеточной популяции, что, таким образом, подтверждает пригодность систем тестирования для определения характеристик антител согласно настоящему изобретению. Обнаружено сильное связывание антитела 16-B-03 в качестве иллюстративного примера гуманизированных антител согласно настоящему изобретению с вариантом iRhom2 макаки-резус, экспрессируемым на клетках MEF-DKO-Rhesus-iR2-FL-WT-T7 (фиг. 4b, справа) по сравнению с отсутствием значительного связывания с клетками MEF-DKO-Rhesus-iR1-FL-WT-T7 (фиг. 4b, середина). Это свидетельствует о том, что вариант iRhom2 макаки-резуса специфически распознается гуманизированным антителом 16-B-03 согласно настоящему изобретению, по сравнению с отсутствием распознавания iRhom1 макаки-резус, присутствие которого на клеточной поверхности подтверждено с помощью анти-T7 меченого антитела (фиг. 4а, в центре). Аналогичные результаты были получены с гуманизированными антителами 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02, 42-B-04 согласно настоящему изобретению, демонстрируя, что все эти гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению распознают iRhom2 макаки-резус, но не распознают iRhom1 макаки-резус.

На фиг. 5а и 5b показаны репрезентативные результаты анализа перекрестной реактивности на яванских макаках. По сравнению с окрашиванием контрольных клеток MEF-DKO-EV (фиг. 5а, слева, идентично фиг. 2а, слева), MEF-DKO-Cyno-iR1-FL-WT-T7 (фиг. 5а, в центре) и MEF-DKO-Cyno-iR2-FL-WT-T7 (фиг. 5а, справа), сильное увеличение относительной интенсивности флуоресценции, полученное на MEF-DKO-Cyno-iR1-FL-WT-T7 и MEF-DKO-Cyno-iR2-FL-WT-T7 с анти-T7 меченым антителом демонстрирует, что, подобно вариантам iRhom1 и 2 человека, варианты iRhom1 и 2 яванского макака также

расположены на поверхности этой генетически сконструированной клеточной популяции, что, таким образом, подтверждает пригодность систем тестирования для определения характеристик антител согласно настоящему изобретению. Обнаружено сильное связывание антитела 16-B-03 в качестве иллюстративного примера гуманизированных антител согласно настоящему изобретению с вариантом iRhom2 яванского макака, экспрессированным на клетках MEF-DKO-Cyno-iR2-FL-WT-T7 (фиг. 5b, справа), по сравнению с отсутствием значительного связывания с клетками MEF-DKO-Cyno-iR1-FL-WT-T7 (фиг. 5b, в центре). Это свидетельствует о том, что вариант iRhom2 яванского макака специфически распознается гуманизированным антителом 16-B-03 согласно настоящему изобретению, по сравнению с отсутствием распознавания iRhom1 яванского макака, присутствие которого на клеточной поверхности подтверждено с помощью анти-T7 меченного антитела (фиг. 5a, в центре). Подобные результаты были получены с гуманизированными антителами 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02, 42-B-04 согласно настоящему изобретению, демонстрируя, что все эти гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению распознают iRhom2 яванского макака, но не распознают iRhom1 яванского макака.

На фиг. 6a и 6b показаны репрезентативные результаты анализа перекрестной реактивности с собакой. По сравнению с окрашиванием контрольных клеток MEF-DKO-EV (фиг. 6a, слева, идентично фиг. 2a, слева), MEF-DKO-Dog-iR1-FL-WT-T7 (фиг. 6a, в центре) и MEF-DKO-Dog-iR2-FL-WT-T7 (фиг. 6a, справа), сильное увеличение относительной интенсивности флуоресценции, полученное на MEF-DKO-Dog-iR1-FL-WT-T7 и MEF-DKO-Dog-iR2-FL-WT-T7 с анти-T7-меточным антителом демонстрирует, что, подобно вариантам iRhom1 и 2 человека, варианты iRhom1 и 2 собаки также расположены на поверхности этой генетически сконструированной клеточной популяции, что, таким образом, подтверждает пригодность системы тестирования для определения характеристик антител согласно настоящему изобретению. Обнаружено сильное связывание антитела 16-B-03 в качестве иллюстративного примера гуманизированных антител согласно настоящему изобретению с вариантом iRhom2 собаки, экспрессируемым на клетках MEF-DKO-Dog-iR2-FL-WT-T7 (фиг. 6b, справа), по сравнению с отсутствием значительного связывания с клетками MEF-DKO-Dog-iR1-FL-WT-T7 (фиг. 6b, в центре). Это свидетельствует о том, что вариант iRhom2 собаки специфически распознается гуманизированным антителом 16-B-03 согласно настоящему изобретению, по сравнению с отсутствием распознавания iRhom1 собаки, присутствие которого на клеточной поверхности подтверждается анти-T7-меточным антителом (фиг. 6a, в центре). Подобные результаты получили для гуманизированных антител 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02,

42-B-04 согласно настоящему изобретению, демонстрирующие, что все эти гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению распознают iRhom2 собаки, но не распознают iRhom1 собаки.

На фиг. 7а и 7б показаны репрезентативные результаты анализа перекрестной реактивности с кроликом. По сравнению с окрашиванием контрольных клеток MEF-DKO-EV (на фиг. 7а, слева, идентично фиг. 2а, слева), MEF-DKO-Rabbit-iR1-FL-WT-T7 (на фиг. 7а, в центре) и MEF-DKO-Rabbit-iR2-FL-WT-T7 (на фиг. 7а, справа), сильное увеличение относительной интенсивности флуоресценции, полученное на MEF-DKO-Rabbit-iR1-FL-WT-T7 и MEF-DKO-Rabbit-iR2-FL-WT-T7 с анти-T7 меченым антителом демонстрирует, что, подобно вариантам iRhom1 и 2 человека, варианты iRhom1 и 2 кролика также расположены на поверхности этой генетически сконструированной клеточной популяции, что, таким образом, подтверждает пригодность системы тестирования для определения характеристик антител согласно настоящему изобретению. Обнаружено сильное связывание антитела 16-B-03 в качестве иллюстративного примера гуманизированных антител согласно настоящему изобретению с вариантом iRhom2 кролика, экспрессируемым на клетках MEF-DKO-Rabbit-iR2-FL-WT-T7 (фиг. 7б, справа) по сравнению с отсутствием значительного связывания с клетками MEF-DKO-Rabbit-iR1-FL-WT-T7 (фиг. 7б, в центре). Это свидетельствует о том, что вариант iRhom2 кролика специфически распознается гуманизированным антителом 16-B-03 согласно настоящему изобретению, по сравнению с отсутствием распознавания iRhom1 кролика, присутствие которого на клеточной поверхности подтверждено анти-T7-меточным антителом (фиг. 7а, в центре). Подобные результаты получили для гуманизированных антител 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02, 42-B-04 согласно настоящему изобретению, демонстрирующие, что все эти гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению распознают iRhom2 кролика, но не распознают iRhom1 кролика.

Пример 6. Анализ ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на LPS-индуцированный шеддинг TNF α in vitro

В следующем исследовании анализы на основе ELISA высвобождения TNF α проводили для проверки ингибирующего действия гуманизированных антител согласно настоящему изобретению на LPS-индуцированное высвобождение эндогенного TNF α из моноцитарных клеток THP-1 человека.

Анализ на основе ELISA высвобождения TNF α , который использовали в этом примере, описан ниже.

Кратко, в день 1 черные 96-луночные планшеты Nunc MaxiSorp® (Thermo Fisher Scientific, USA) покрывали в течение ночи 100 мкл на лунку мышинового анти-человеческий TNF α захватывающего антитела (представлено как часть набора DuoSet ELISA) при 4 мкг/мл TBS при 4°C. В день 2 раствор захватывающих антител удаляли и планшеты MaxiSorp® блокировали с 300 мкл на лунку TBS, 1% BSA при комнатной температуре в течение 1-2 часов. При этом 20000 клеток THP-1 (Американская коллекция типовых культур, USA) в 80 мкл нормальной питательной среды высевали в каждую лунку 96-луночных планшетов Greiner КЛЕТКИТАР с V-образным дном (Greiner Bio-One, Germany) и предварительно инкубировали с 20 мкл на лунку стандартной питательной среды с добавлением батимастата (BB94, Abcam, UK) при 50 мкМ в качестве положительного контроля (для конечной концентрации 10 мкМ в результирующем объеме образца 100 мкл), человеческого IgG антитела (BioLegend, USA) при 15 мкг/мл в качестве изотипического контроля (для конечной концентрации 3 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) или гуманизированных антител согласно настоящему изобретению при 15 мкг/мл (для конечной концентрации 3 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) при 37°C, 5 % CO₂ в течение 30 минут. В случае контролей стимуляции 20 мкл стандартной питательной среды без тестируемых образцов добавляли. Затем клетки (за исключением клеток для нестимулированных контролей) стимулировали с 20 мкл на лунку LPS (Sigma-Aldrich, USA) при 300 нг/мл в питательной среде для конечной концентрации 50 нг/мл при 37°C, 5 % CO₂ в течение 2 часов. После этого 96-луночные планшеты центрифугировали для осаждения клеток. Параллельным образом, блокирующий буфер удаляли с планшетов MaxiSorp® и планшеты промывали 4 раза с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland). Для того, чтобы избежать высыхания, 30 мкл TBS добавляли в каждую лунку планшетов MaxiSorp® немедленно, с последующим переносом 70 мкл бесклеточного супернатанта на образец. Дополнительно, 100 мкл рекомбинантного человеческого белка TNF α (представленного как часть набора DuoSet ELISA), разведенного в TBS в определенных концентрациях, добавляли на планшет в качестве стандартных эталонов. После этого 100 мкл биотинилированного козьего анти-человеческий TNF α антитела обнаружения (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 50 нг/мл TBS добавляли на лунку, и защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл стрептавидин-AP (R&D Systems, USA), разведенный 1:10000 в TBS, добавляли в каждую лунку, и снова

защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После другого раунда из четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл раствора субстрата AttoPhos (Promega, USA) на лунку добавляли для инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа. С помощью устройства для чтения микропланшетов Infinity M1000 (Tecan Group, Switzerland) регистрировали флуоресценцию каждой лунки при длине волны возбуждения 435 нм и длине волны испускания 555 нм.

На фиг. 8 показаны репрезентативные результаты этого эксперимента, демонстрирующие влияние тестируемого образца на LPS-индуцированное высвобождение TNF α из клеток THP-1 в абсолютных количествах (на фиг. 8a) и проценте ингибирования (на фиг. 8b). В то время как батимастат (BB94) в качестве низкомолекулярного ингибитора металлопротеиназ служит в качестве положительного контроля и приводит к сильному ингибированию LPS-индуцированного высвобождения TNF α , присутствие изотипического контроля IgG не оказало существенного влияния на шеддинг TNF α . Напротив, равная концентрация гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению ингибирует LPS-индуцированное высвобождение TNF α из клеток THP-1 на 75,1 %, 78,7 %, 77,2 %, 77,6 %, 75,2 % и 76,1 %, соответственно.

Пример 7. Анализ ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на PMA-индуцированный шеддинг TNF α in vitro

В отличие от примера 6, где исследовали ингибирующее действие антител согласно настоящему изобретению на LPS-индуцированное высвобождение эндогенного TNF α из человеческих клеток THP-1, этот анализ проводили для проверки ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на PMA-индуцированное высвобождение эндогенного TNF α из моноцитарных клеток U-937 человека.

Анализ высвобождения на основе ELISA TNF α , который использовали в этом примере, описан ниже.

Кратко, в день 1 черные 96-луночные планшеты Nunc MaxiSorp® (Thermo Fisher Scientific, USA) покрывали на всю ночь с 100 мкл на лунку мышиного анти-человеческий TNF α захватывающего антитела (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 4 мкг/мл TBS при 4°C. В день 2 раствор захватывающего антитела удаляли и планшеты MaxiSorp® блокировали с 300 мкл на лунку TBS, 1 % BSA при комнатной температуре в течение 1-2 часов. Между тем, клетки 75000 U-937 (Европейская коллекция аутентифицированных клеточных культур, Великобритания) в 80 мкл нормальной

питательной среды высевали в каждую лунку 96-луночных планшетов Greiner CELLSTAR с V-образным дном (Greiner Bio-One, Germany) и предварительно инкубировали с 20 мкл на лунку стандартной питательной среды с добавлением батимастата (BB94, Abcam, UK) при 50 мкМ в качестве положительного контроля (для конечной концентрации 10 мкМ в результирующем объеме образца 100 мкл), человеческого IgG антитела (BioLegend, USA) при 50 мкг/мл в качестве изотипического контроля (для конечной концентрации 10 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) или антител согласно настоящему изобретению при 16,66 мкг/мл (для конечной концентрации 3,33 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) при 37°C, 5 % CO₂ в течение 30 минут. В случае контролей стимуляции 20 мкл стандартной питательной среды без тестируемых образцов добавляли. Затем клетки (за исключением клеток для нестимулированных контролей) стимулировали с 20 мкл на лунку PMA (Sigma-Aldrich, USA) при 150 нг/мл в питательной среде для конечной концентрации 25 нг/мл при 37°C, 5 % CO₂ в течение 1 часа. После этого 96-луночные планшеты центрифугировали для осаждения клеток. Параллельным образом, блокирующий буфер удаляли с планшетов MaxiSorp® и планшеты промывали 4 раза с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland). Для того, чтобы избежать высыхания, 30 мкл TBS добавляли в каждую лунку планшетов MaxiSorp® немедленно, с последующим переносом 70 мкл бесклеточного супернатанта на образец. Дополнительно, 100 мкл рекомбинантного человеческого белка TNF α (представленного как часть набора DuoSet ELISA), разведенного в TBS в определенных концентрациях, добавляли на планшет в качестве стандартных эталонов. После этого 100 мкл биотинилированного козьего анти-человеческий TNF α антитела обнаружения (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 50 нг/мл TBS добавляли на лунку, и защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл стрептавидин-AP (R&D Systems, USA), разведенный 1:10000 в TBS, добавляли в каждую лунку, и снова защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После другого раунда из четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл раствора субстрата AttoPhos (Promega, USA) на лунку добавляли для инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа. С помощью устройства для чтения микропланшетов Infinity M1000 (Tecan Group, Switzerland) регистрировали

флуоресценцию каждой лунки при длине волны возбуждения 435 нм и длине волны испускания 555 нм.

На фиг. 9 показаны репрезентативные результаты этого эксперимента, демонстрирующие влияние тестируемого образца на РМА-индуцированное высвобождение TNF α из клеток U-937 в абсолютных количествах (на фиг. 9a) и проценте ингибирования (на фиг. 9b). В то время как батимастат (BB94) в качестве низкомолекулярного ингибитора металлопротеиназ служит в качестве положительного контроля и приводит к сильному ингибированию РМА-индуцированного высвобождения TNF α , присутствие изотипического контроля IgG не оказало существенного влияния на шеддинг TNF α . Напротив, гуманизированные антитела 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению ингибируют РМА-индуцированное высвобождение TNF α из клеток U-937 на 89,8%, 89,0 %, 90,3 %, 77,2 %, 85,0 % и 87,9 %, соответственно.

Пример 8. Анализ ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на РМА-индуцированный шеддинг рецептора интерлейкина 6 (IL-6R) *in vitro*

В следующем исследовании анализы на основе ELISA высвобождения IL-6R проводили для анализа ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на РМА-индуцированное высвобождение эндогенного IL-6R из моноцитарных клеток THP-1 человека.

Анализ на основе ELISA высвобождения IL-6R, который использовали в этом примере, описан ниже.

Кратко, в день 1 черные 96-луночные планшеты Nunc MaxiSorp® (Thermo Fisher Scientific, USA) покрывали на всю ночь с 100 мкл на лунку мышинового анти-человеческий IL-6R захватывающего антитела (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 2 мкг/мл TBS при 4°C. В день 2 раствор захватывающего антитела удаляли и планшеты MaxiSorp® блокировали с 300 мкл на лунку TBS, 1 % BSA при комнатной температуре в течение 1-2 часов. Между тем, 40000 клеток THP-1 (Американская коллекция типовых культур, USA) в 80 мкл нормальной питательной среды высевали в каждую лунку 96-луночных планшетов Greiner CELLSTAR с V-образным дном (Greiner Bio-One, Germany) и предварительно инкубировали с 20 мкл на лунку стандартной питательной среды с добавлением батимастата (BB94, Abcam, UK) при 50 мкМ в качестве положительного контроля (для конечной концентрации 10 мкМ в результирующем объеме образца 100 мкл), человеческого IgG антитела (BioLegend, USA) при 15 мкг/мл в качестве изотипического

контроля (для конечной концентрации 3 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) или антител согласно настоящему изобретению при 15 мкг/мл (для конечной концентрации 3 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) при 37°C, 5 % CO₂ в течение 30 минут. В случае контролей стимуляции 20 мкл стандартной питательной среды без тестируемых образцов добавляли. Затем клетки (за исключением клеток для нестимулированных контролей) стимулировали с 20 мкл на лунку PMA (Sigma-Aldrich, USA) при 150 нг/мл в питательной среде для конечной концентрации 25 нг/мл при 37°C, 5 % CO₂ в течение 1 часа. После этого 96-луночные планшеты центрифугировали для осаждения клеток. Параллельным образом, блокирующий буфер удаляли с планшетов MaxiSorp® и планшеты промывали 4 раза с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland). Для того, чтобы избежать высыхания, 30 мкл TBS добавляли в каждую лунку планшетов MaxiSorp® немедленно, с последующим переносом 70 мкл бесклеточного супернатанта на образец. Дополнительно, 100 мкл рекомбинантного человеческого белка IL-6R (представленного как часть набора DuoSet ELISA), разведенного в TBS в определенных концентрациях, добавляли на планшет в качестве стандартных эталонов. После этого 100 мкл биотинилированного козьего анти-человеческий IL-6R антитела обнаружения (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 100 нг/мл TBS добавляли на лунку, и защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл стрептавидин-AP (R&D Systems, USA), разведенный 1:10000 в TBS, добавляли в каждую лунку, и снова защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После другого раунда из четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл раствора субстрата AttoPhos (Promega, USA) на лунку добавляли для инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа. С помощью устройства для чтения микропланшетов Infinity M1000 (Tecan Group, Switzerland) регистрировали флуоресценцию каждой лунки при длине волны возбуждения 435 нм и длине волны испускания 555 нм.

На фиг. 10a и 10b показаны репрезентативные результаты этого эксперимента, демонстрирующие эффекты тестируемых образцов на PMA-индуцированное высвобождение IL-6R из клеток THP-1 в абсолютных количествах (на фиг. 10a) и проценте ингибирования (на фиг. 10b). В то время как батимаSTAT (BB94) в качестве

низкомолекулярного ингибитора металлопротеиназ служит в качестве положительного контроля и приводит к сильному ингибированию РМА-индуцированного высвобождения IL-6R, присутствие изотипического контроля IgG не оказало существенного влияния на шеддинг IL-6R. Напротив, равная концентрация гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению ингибирует РМА-индуцированное высвобождение IL-6R из клеток ТНР-1 на 75,6 %, 74,0 %, 75,6 %, 70,1 %, 68,5 % и 71,6 %, соответственно.

Пример 9. Анализ ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на РМА-индуцированный шеддинг рецептора интерлейкина 6 (IL-6R) *in vitro*

В дополнение к примеру 8, описанному выше, анализы на основе ELISA высвобождения IL-6R проводили для исследования ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на РМА-индуцированное высвобождение эндогенного IL-6R из клеток U-937 человека.

Анализ высвобождения IL-6R на основе ELISA, который использовали в этом примере, описан ниже.

Кратко, в день 1 черные 96-луночные планшеты Nunc MaxiSorp® (Thermo Fisher Scientific, USA) покрывали на всю ночь с 100 мкл на лунку мышинового анти-человеческий IL-6R захватывающего антитела (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 2 мкг/мл TBS при 4°C. В день 2 раствор захватывающего антитела удаляли и планшеты MaxiSorp® блокировали с 300 мкл на лунку TBS, 1 % BSA при комнатной температуре в течение 1-2 часов. Между тем, 75000 клеток U-937 (Европейская коллекция аутентифицированных клеточных культур, Великобритания) в 80 мкл нормальной питательной среды высевали в каждую лунку 96-луночных планшетов Greiner CELLSTAR с V-образным дном (Greiner Bio-One, Germany) и предварительно инкубировали с 20 мкл на лунку стандартной питательной среды с добавлением батимастата (BB94, Abcam, UK) при 50 мкМ в качестве положительного контроля (для конечной концентрации 10 мкМ в результирующем объеме образца 100 мкл), человеческого IgG антитела (BioLegend, USA) при 50 мкг/мл в качестве изотипического контроля (для конечной концентрации 10 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) или антител согласно настоящему изобретению при 16,66 мкг/мл (для конечной концентрации 3,33 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) при 37°C, 5 % CO₂ в течение 30 минут. В случае контролей стимуляции 20 мкл стандартной питательной среды без тестируемых образцов добавляли. Затем клетки (за исключением клеток для нестимулированных контролей) стимулировали

с 20 мкл на лунку PMA (Sigma-Aldrich, USA) при 150 нг/мл в питательной среде для конечной концентрации 25 нг/мл при 37°C, 5 % CO₂ в течение 1 часа. После этого 96-луночные планшеты центрифугировали для осаждения клеток. Параллельным образом, блокирующий буфер удаляли с планшетов MaxiSorp® и планшеты промывали 4 раза с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland). Для того, чтобы избежать высыхания, 30 мкл TBS добавляли в каждую лунку планшетов MaxiSorp® немедленно, с последующим переносом 70 мкл бесклеточного супернатанта на образец. Дополнительно, 100 мкл рекомбинантного человеческого белка IL-6R (представленного как часть набора DuoSet ELISA), разведенного в TBS в определенных концентрациях, добавляли на планшет в качестве стандартных эталонов. После этого 100 мкл биотинилированного козьего анти-человеческий IL-6R антитела обнаружения (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 100 нг/мл TBS добавляли на лунку, и защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл стрептавидин-AP (R&D Systems, USA), разведенный 1:10000 в TBS, добавляли в каждую лунку, и снова защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После другого раунда из четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл раствора субстрата AttoPhos (Promega, USA) на лунку добавляли для инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа. С помощью устройства для чтения микропланшетов Infinity M1000 (Tecan Group, Switzerland) регистрировали флуоресценцию каждой лунки при длине волны возбуждения 435 нм и длине волны испускания 555 нм.

На фиг. 11 показаны репрезентативные результаты этого эксперимента, демонстрирующие влияние тестируемого образца на PMA-индуцированное высвобождение IL-6R из клеток U-937 в абсолютных количествах (на фиг. 11a) и проценте ингибирования (на фиг. 11b). В то время как батимастат (BB94) в качестве низкомолекулярного ингибитора металлопротеиназ служит в качестве положительного контроля и приводит к сильному ингибированию PMA-индуцированного высвобождения IL-6R, присутствие изотипического контроля IgG не оказало существенного влияния на шеддинг IL-6R. Напротив, гуманизированные антитела 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению ингибируют PMA-индуцированное

высвобождение IL-6R из клеток U-937 на 79,6 %, 81,7 %, 77,5 %, 77,8 %, 78,3 % и 82,4 %, соответственно.

Пример 10. Анализ ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на PMA-индуцированный шеддинг гепарин-связывающего EGF-подобного фактора роста (HB-EGF) *in vitro*

В следующем исследовании анализы высвобождения HB-EGF на основе ELISA проводили для анализа ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на PMA-индуцированное высвобождение эндогенного HB-EGF из моноцитарных клеток THP-1 человека.

Анализ высвобождения HB-EGF на основе ELISA, который использовали в этом примере, описан ниже.

Кратко, в день 1 черные 96-луночные планшеты Nunc MaxiSorp® (Thermo Fisher Scientific, USA) покрывали на всю ночь с 100 мкл на лунку крысиного анти-человеческий HB-EGF захватывающего антитела (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 2 мкг/мл TBS при 4°C. 40000 THP-1 (Американская коллекция типовых культур, USA) клетки в 80 мкл нормальной питательной среды высевали в каждую лунку 96-луночных планшетов Greiner CELLSTAR с V-образным дном (Greiner Bio-One, Germany) и предварительно инкубировали с 20 мкл на лунку стандартной питательной среды с добавлением батимастата (BB94, Abcam, UK) при 50 мкМ в качестве положительного контроля (для конечной концентрации 10 мкМ в результирующем объеме образца 100 мкл), человеческого IgG антитела (BioLegend, USA) при 15 мкг/мл в качестве изотипического контроля (для конечной концентрации 3 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) или антител согласно настоящему изобретению при 15 мкг/мл (для конечной концентрации 3 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) при 37°C, 5 % CO₂ в течение 30 минут. В случае контролей стимуляции 20 мкл стандартной питательной среды без тестируемых образцов добавляли. Затем клетки (за исключением клеток для нестимулированных контролей) стимулировали с 20 мкл на лунку PMA (Sigma-Aldrich, USA) при 150 нг/мл в питательной среде для конечной концентрации 25 нг/мл при 37°C, 5 % CO₂ в течение 24 часов. В день 2 раствор захватывающего антитела удаляли и планшеты MaxiSorp® блокировали с 300 мкл на лунку TBS, 1 % BSA при комнатной температуре в течение 1-2 часов. После этого 96-луночные планшеты центрифугировали для осаждения клеток. Параллельным образом, блокирующий буфер удаляли с планшетов MaxiSorp® и планшеты промывали 4 раза с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland). Для того, чтобы избежать высыхания,

30 мкл TBS добавляли в каждую лунку планшетов MaxiSorp® немедленно, с последующим переносом 70 мкл бесклеточного супернатанта на образец. Дополнительно, 100 мкл рекомбинантного человеческого белка HB-EGF (представленного как часть набора DuoSet ELISA), разведенного в TBS в определенных концентрациях, добавляли на планшет в качестве стандартных эталонов. После этого планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл биотинилированного козьего анти-человеческий HB-EGF антитела обнаружения (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 50 нг/мл TBS добавляли на лунку, и защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл стрептавидин-AP (R&D Systems, USA), разведенный 1:10000 в TBS, добавляли в каждую лунку, и снова защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После другого раунда из четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл раствора субстрата AttoPhos (Promega, USA) на лунку добавляли для инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа. С помощью устройства для чтения микропланшетов Infinity M1000 (Tecan Group, Switzerland) регистрировали флуоресценцию каждой лунки при длине волны возбуждения 435 нм и длине волны испускания 555 нм.

На фиг. 12 показаны репрезентативные результаты этого эксперимента, демонстрирующие влияние тестируемого образца на PMA-индуцированное высвобождение HB-EGF из клеток THP-1 в абсолютных количествах (на фиг. 12a) и проценте ингибирования (на фиг. 12b). В то время как батимагат (BB94) в качестве низкомолекулярного ингибитора металлопротеиназ служит в качестве положительного контроля и приводит к сильному ингибированию PMA-индуцированного высвобождения HB-EGF, присутствие изоипического контроля IgG человека не оказало значительного влияния на шеддинг HB-EGF. Напротив, равная концентрация гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению ингибирует PMA-индуцированное высвобождение HB-EGF из клеток THP-1 на 80,2 %, 83,0 %, 80,5 %, 84,4 %, 81,2 % и 86,2 %, соответственно.

Пример 11. Анализ ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на РМА-индуцированный шеддинг HB-EGF *in vitro*

В дополнение к примеру 10, описанному выше, анализы высвобождения HB-EGF на основе ELISA проводили для исследования ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на РМА-индуцированное высвобождение эндогенного HB-EGF из клеток U-937 человека.

Анализ высвобождения HB-EGF на основе ELISA, который использовали в этом примере, идентичен анализу, описанному в примере 10, с той лишь разницей, что клетки U-937 (Европейская коллекция аутентифицированных клеточных культур, Великобритания) (80000 клеток/лунка) использовали вместо клеток THP-1 (American Type Culture Collection, USA).

На фиг. 13 показаны репрезентативные результаты этого эксперимента, демонстрирующие влияние тестируемого образца на РМА-индуцированное высвобождение HB-EGF из клеток U-937 в абсолютных количествах (на фиг. 13a) и проценте ингибирования (на фиг. 13b). В то время как батимагат (BB94) в качестве низкомолекулярного ингибитора металлопротеиназ служит в качестве положительного контроля и приводит к сильному ингибированию РМА-индуцированного высвобождения HB-EGF, присутствие изотипического контроля IgG человека почти не влияет на шеддинг HB-EGF. Напротив, равная концентрация гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению ингибирует РМА-индуцированное высвобождение HB-EGF из клеток U-937 на 99,2 %, 99,7 %, 99,2 %, 99,5 %, 98,8 % и 99,4 %, соответственно.

Пример 12. Анализ ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на РМА-индуцированный шеддинг трансформирующего фактора роста альфа (TGF α) *in vitro*

В следующем исследовании анализы высвобождения TGF α на основе ELISA проводили для анализа ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на РМА-индуцированное высвобождение эндогенного TGF α из клеток рака предстательной железы человека PC3.

Анализ высвобождения TGF α на основе ELISA, который использовали в этом примере, описан ниже.

Кратко, в день 1 черные 96-луночные планшеты Nunc MaxiSorp® (Thermo Fisher Scientific, USA) покрывали на всю ночь с 100 мкл на лунку козьиного анти-человеческий TGF α захватывающего антитела (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 0,4

мкг/мл TBS при 4°C. 80000 клеток РС3 (Европейская коллекция аутентифицированных клеточных культур, Великобритания) в 100 мкл нормальной питательной среды высевали в каждую лунку 96-луночных культуральных планшетов с F-образным дном (Corning, USA) и инкубировали при 37°C, 5 % CO₂ всю ночь. В день 2 раствор захватывающего антитела удаляли и планшеты MaxiSorp® блокировали с 300 мкл на лунку TBS, 1 % BSA при комнатной температуре в течение 1-2 часов. Между тем, клетки промывали один раз с PBS и предварительно инкубировали в 80 мкл среды OptiMEM с 20 мкл на лунку среды OptiMEM с добавлением батимастата (BB94, Abcam, UK) при 50 мкМ в качестве положительного контроля (для конечной концентрации 10 мкМ в результирующем объеме образца 100 мкл), человеческого IgG антитела (BioLegend, USA) при 50 мкг/мл в качестве изотипического контроля (для конечной концентрации 10 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) или антител согласно настоящему изобретению при 50 мкг/мл (для конечной концентрации 10 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) при 37°C, 5 % CO₂ в течение 30 минут. В случае контролей стимуляции 20 мкл среды OptiMEM без тестируемых образцов добавляли. Затем клетки (за исключением клеток для нестимулированных контролей) стимулировали с 20 мкл на лунку PMA (Sigma-Aldrich, USA) при 150 нг/мл в OptiMEM для конечной концентрации 25 нг/мл при 37°C, 5 % CO₂ в течение 2 часов. Параллельным образом, блокирующий буфер удаляли с планшетов MaxiSorp® и планшеты промывали 4 раза с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland). Для того, чтобы избежать высыхания, 20 мкл TBS добавляли в каждую лунку планшетов MaxiSorp® немедленно, с последующим переносом 80 мкл бесклеточного супернатанта на образец. Дополнительно, 100 мкл рекомбинантного человеческого белка TGF α (представленного как часть набора DuoSet ELISA), разведенного в TBS в определенных концентрациях, добавляли на планшет в качестве стандартных эталонов. После этого 100 мкл биотинилированного козьего анти-человеческий TGF α антитела обнаружения (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 37,5 нг/мл в TBS, добавляли на лунку, и защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл стрептавидин-AP (R&D Systems, USA), разведенный 1:10000 в TBS, добавляли в каждую лунку, и снова защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После другого раунда из четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета

(Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл раствора субстрата AttoPhos (Promega, USA) на лунку добавляли для инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа. С помощью устройства для чтения микропланшетов Infinity M1000 (Tecan Group, Switzerland) регистрировали флуоресценцию каждой лунки при длине волны возбуждения 435 нм и длине волны испускания 555 нм.

На фиг. 14 показаны репрезентативные результаты этого эксперимента, демонстрирующие влияние тестируемого образца на РМА-индуцированное высвобождение TGF α из клеток РС3 в абсолютных количествах (на фиг. 14а) и проценте ингибирования (на фиг. 14b). В то время как батимаSTAT (BB94) в качестве низкомолекулярного ингибитора металлопротеиназ служит в качестве положительного контроля и приводит к 90,7 % ингибированию РМА-индуцированного высвобождения TGF α , присутствие изотипического контроля IgG не оказывает ингибирующее действие на шеддинг TGF α . Только очень умеренный эффект на шеддинг TGF α был обнаружен в присутствии равных концентраций гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению, которые ингибируют РМА-индуцированное высвобождение TGF α из клеток РС3 на 15,9 %, 23,8 %, 3,3 %, 21,3 %, 6,4 % и 19,5 %, соответственно.

Пример 13. Оценка специфичности связывания антител согласно настоящему изобретению в клеточных линиях, эндогенно экспрессирующих iRhom2

В этом исследовании проводили анализ специфичности связывания гуманизированного антитела 42-B-02 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению в клеточных линиях, эндогенно экспрессирующих iRhom2. Исследования проводили на клетках RPMI-8226, В-лимфоцитарной клеточной линии человека, эндогенно экспрессирующей iRhom2, но эндогенно отрицательной по iRhom1, на клетках THP-1, моноцитарной клеточной линии человека, эндогенно экспрессирующей как iRhom2, так и iRhom1, и на клетках RH-30, фибробластной клеточной линии человека, эндогенно отрицательной по iRhom2, но эндогенно экспрессирующей iRhom1.

Кратко, клетки RPMI-8226 человека (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Германия), клетки THP-1 (Американская коллекция типовых культур, USA) и клетки RH-30 (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Германия) собирали с 10 мМ EDTA в PBS, промывали и ресуспендировали в буфере FACS (PBS, 3 % FBS, 0,05 % азида натрия), и высевали в 96-луночные планшеты Nunc с U-

образным дном (Thermo Fisher Scientific, USA) при приблизительно 2×10^5 клеток на лунку. Для осаждения клеток и удаления супернатантов планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут. Для первичного окрашивания клетки ресуспендировали в 100 мкл на лунку либо только буфера FACS (контроли) или 3 мкг/мл антител согласно настоящему изобретению в буфере FACS и инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут и промывали дважды с 200 мкл на лунку буфера FACS. Для вторичного окрашивания клетки центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл на лунку фрагмента обнаружения PE-конъюгированного козьего анти-человеческий IgG F(ab')₂ (Dianova, Germany), разведенный 1:100 в буфере FACS. Защищенные от света клеточные суспензии инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут и промывали три раза с 200 мкл на лунку буфера FACS. Наконец, клетки ресуспендировали в 150 мкл на лунку буфера FACS и анализировали с помощью проточного цитометра BD Accuri™ C6 Plus (Becton Dickinson, Germany).

На фиг. 15 показаны репрезентативные результаты этого исследования. По сравнению с контрольными образцами, инкубированными только со вторичным антителом (серые), совместная инкубация как клеток RPMI-8226, так и клеток THP-1, каждая из которых эндогенно экспрессирует iRhom2, с гуманизированным антителом 42-B-02 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению (слева и в центре, черный) приводит к сильному сдвигу относительной интенсивности флуоресценции в обеих клеточных линиях, демонстрируя сильное связывание гуманизированного антитела 42-B-02 согласно настоящему изобретению с двумя клеточными линиями человека, эндогенно положительными в отношении iRhom2. Напротив, связывание гуманизированного антитела 42-B-02 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению (справа, черный) с клетками RH-30, которые не экспрессируют iRhom2, не обнаруживается, что свидетельствует о том, что эндогенно экспрессируемый iRhom2 специфически распознается гуманизированным антителом 42-B-02 согласно настоящему изобретению.

Пример 14. Картирование эпитопов антител согласно настоящему изобретению на основе единичных аминокислотных замен или делеций в большой внеклеточной петле

На сегодняшний день доступно несколько способов картирования эпитопов, распознаваемых антителами, включая рентгеновскую сокристаллографию и

криогенную электронную микроскопию, сканирование олигопептидов на основе массива, водородно-дейтериевый обмен и масс-спектрометрия с введением перекрестных сшивок. Генетические подходы, такие как сайт-направленный мутагенез или мутагенез методов дробовика высокой пропускной способности, позволяют картировать эпитопы с разрешением одной аминокислоты. Однако аминокислотные замены в случайных положениях белка или замены неродственными аминокислотами несут риск вызвать конформационные изменения и/или функциональную потерю белка и, таким образом, могут привести к неверным интерпретациям относительно того, вносит ли замещенная аминокислота вклад в эпитоп антитела. Удобным и общепринятым способом преодоления этих рисков является замена отдельных аминокислот данного белка гомологичными аминокислотами структурно родственного белка, т.е. ортолога или близкородственного члена семейства, при условии, что эти родственные белки не распознаются представляющими интерес антителами. Как описано ранее, и то, и другое верно для всех гуманизированных антител против iRhom2 человека согласно настоящему изобретению, поскольку было продемонстрировано, что они не обладают перекрестной реактивностью с мышинным ортологом (Пример 3) и не связываются с близкородственным членом семейства iRhom1 человека (Пример 4). Кроме того, замена отдельных аминокислот данного белка на аминокислоту аланин представляет собой широко используемый подход для картирования эпитопов.

Таким образом, в подходе для идентификации отдельных аминокислот, которые способствуют связыванию антител согласно настоящему изобретению, разработали плазмиды для набора из 137 вариантов iRhom2 человека либо с единичными аминокислотными заменами из родственного iRhom2 мыши, либо с единичными аминокислотными заменами из родственного iRhom1 человека, либо с единичными аминокислотными заменами на аланин. Эти 137 замен отражают аминокислоты в большой внеклеточной петле 1 (AA502 - AA594 в iRhom2 человека), которые либо не идентичны у iRhom2 человека по сравнению с iRhom2 мыши, либо не идентичны у iRhom2 человека по сравнению с iRhom1 человека, либо где соответствующая аминокислота в iRhom2 человека заменена на аланин. Вместо аминокислоты iRhom2 человека вводили аминокислоту в соответствующем положении iRhom2 мыши или iRhom1 человека или аминокислоту iRhom2 человека заменяли на аланин. В случае отсутствия соответствующей аминокислоты в iRhom2 мыши или iRhom1 человека, соответствующую аминокислоту iRhom2 человека удаляли, с получением вариантов hiR2-FL-Q502R-T7, hiR2-FL-N503A-T7, hiR2-FL-D504A-T7, hiR2-FL-H505R-T7, hiR2-FL-H505A-T7, hiR2-FL-S506A-T7, hiR2-FL-G507A-T7, hiR2-FL-C508A-T7, hiR2-FL-I509V-T7, hiR2-FL-I509A-T7, hiR2-FL-Q510A-T7, hiR2-FL-T511A-

T7, hiR2-FL-Q512L-T7, hiR2-FL-Q512S-T7, hiR2-FL-Q512A-T7, hiR2-FL-R513K-T7, hiR2-FL-R513E-T7, hiR2-FL-R513A-T7, hiR2-FL-K514E-T7, hiR2-FL-K514A-T7, hiR2-FL-D515E-T7, hiR2-FL-D515A-T7, hiR2-FL-C516A-T7, hiR2-FL-S517A-T7, hiR2-FL-E518S-T7, hiR2-FL-E518A-T7, hiR2-FL-T519A-T7, hiR2-FL-L520A-T7, hiR2-FL-A521S-T7, hiR2-FL-T522V-T7, hiR2-FL-T522A-T7, hiR2-FL-F523W-T7, hiR2-FL-F523A-T7, hiR2-FL-V524A-T7, hiR2-FL-K525A-T7, hiR2-FL-W526A-T7, hiR2-FL-Q527P-T7, hiR2-FL-Q527A-T7, hiR2-FL-D528N-T7, hiR2-FL-D528I-T7, hiR2-FL-D528A-T7, hiR2-FL-D529H-T7, hiR2-FL-D529A-T7, hiR2-FL-T530P-T7, hiR2-FL-T530A-T7, hiR2-FL-G531S-T7, hiR2-FL-G531A-T7, hiR2-FL-P532A-T7, hiR2-FL-P533--T7, hiR2-FL-P533A-T7, hiR2-FL-M534S-T7, hiR2-FL-M534--T7, hiR2-FL-M534A-T7, hiR2-FL-D535--T7, hiR2-FL-D535A-T7, hiR2-FL-K536--T7, hiR2-FL-K536A-T7, hiR2-FL-S537E-T7, hiR2-FL-S537A-T7, hiR2-FL-D538L-T7, hiR2-FL-D538A-T7, hiR2-FL-L539A-T7, hiR2-FL-G540S-T7, hiR2-FL-G540A-T7, hiR2-FL-Q541H-T7, hiR2-FL-Q541A-T7, hiR2-FL-K542A-T7, hiR2-FL-R543Q-T7, hiR2-FL-R543A-T7, hiR2-FL-T544P-T7, hiR2-FL-T544Q-T7, hiR2-FL-T544A-T7, hiR2-FL-S545F-T7, hiR2-FL-S545A-T7, hiR2-FL-G546A-T7, hiR2-FL-A547V-T7, hiR2-FL-A547S-T7, hiR2-FL-V548A-T7, hiR2-FL-C549A-T7, hiR2-FL-H550A-T7, hiR2-FL-Q551A-T7, hiR2-FL-D552A-T7, hiR2-FL-P553A-T7, hiR2-FL-R554A-T7, hiR2-FL-T555V-T7, hiR2-FL-T555A-T7, hiR2-FL-C556A-T7, hiR2-FL-E557D-T7, hiR2-FL-E557A-T7, hiR2-FL-E558A-T7, hiR2-FL-P559A-T7, hiR2-FL-A560S-T7, hiR2-FL-S561A-T7, hiR2-FL-S562E-T7, hiR2-FL-S562A-T7, hiR2-FL-G563D-T7, hiR2-FL-G563A-T7, hiR2-FL-A564P-T7, hiR2-FL-A564S-T7, hiR2-FL-H565A-T7, hiR2-FL-I566E-T7, hiR2-FL-I566A-T7, hiR2-FL-W567A-T7, hiR2-FL-P568A-T7, hiR2-FL-D569E-T7, hiR2-FL-D569A-T7, hiR2-FL-D570A-T7, hiR2-FL-I571A-T7, hiR2-FL-T572A-T7, hiR2-FL-K573A-T7, hiR2-FL-W574A-T7, hiR2-FL-P575A-T7, hiR2-FL-I576A-T7, hiR2-FL-C577A-T7, hiR2-FL-T578A-T7, hiR2-FL-E579K-T7, hiR2-FL-E579A-T7, hiR2-FL-Q580N-T7, hiR2-FL-Q580A-T7, hiR2-FL-A581S-T7, hiR2-FL-R582A-T7, hiR2-FL-S583G-T7, hiR2-FL-S583A-T7, hiR2-FL-N584A-T7, hiR2-FL-H585A-T7, hiR2-FL-T586A-T7, hiR2-FL-G587N-T7, hiR2-FL-G587A-T7, hiR2-FL-F588H-T7, hiR2-FL-F588A-T7, hiR2-FL-L589P-T7, hiR2-FL-L589A-T7, hiR2-FL-H590A-T7, hiR2-FL-M591A-T7, hiR2-FL-D592A-T7, hiR2-FL-C593A-T7 и hiR2-FL-E594V-T7.

В этом примере описано создание популяций iRhom1/2-/- ДКО MEF, экспрессирующих 137 вариантов с единичными аминокислотными заменами и делециями, а также их характеристика с точки зрения локализации на клеточной поверхности и функциональной активности как индикаторов правильной конформации белка. Далее описаны анализы связывания гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению для всей панели из 137

сконструированных популяций MEF, экспрессирующих варианты iRhom2 человека с единичными аминокислотными заменами или делециями.

Создание iRhom1/2-/- DKO MEF, стабильно экспрессирующих 137 T7-меченных варианта iRhom2 человека с единичными аминокислотными заменами или делециями

Кратко, в день 1 клетки Phoenix-ECO (Американская коллекция типовых культур, USA) высевали на 6-луночные планшеты для тканевых культур (Greiner, Germany) в стандартной питательной среде при 8×10^5 клеток на лунку и хранили всю ночь при 37°C, 5 % CO₂. В день 2 среду заменяли на свежую среду с добавлением хлорохина (Sigma-Aldrich, USA) при конечной концентрации 25 мкМ. Применяя способ на основе фосфата кальция, клетки трансфецировали с 2 мкг/мл pMSCV-hiR2-FL-Q502R-T7, pMSCV-hiR2-FL-N503A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D504A-T7, pMSCV-hiR2-FL-H505R-T7, pMSCV-hiR2-FL-H505A-T7, pMSCV-hiR2-FL-S506A-T7, pMSCV-hiR2-FL-G507A-T7, pMSCV-hiR2-FL-C508A-T7, pMSCV-hiR2-FL-I509V-T7, pMSCV-hiR2-FL-I509A-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q510A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T511A-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q512L-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q512S-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q512A-T7, pMSCV-hiR2-FL-R513K-T7, pMSCV-hiR2-FL-R513E-T7, pMSCV-hiR2-FL-R513A-T7, pMSCV-hiR2-FL-K514E-T7, pMSCV-hiR2-FL-K514A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D515E-T7, pMSCV-hiR2-FL-D515A-T7, pMSCV-hiR2-FL-C516A-T7, pMSCV-hiR2-FL-S517A-T7, pMSCV-hiR2-FL-E518S-T7, pMSCV-hiR2-FL-E518A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T519A-T7, pMSCV-hiR2-FL-L520A-T7, pMSCV-hiR2-FL-A521S-T7, pMSCV-hiR2-FL-T522V-T7, pMSCV-hiR2-FL-T522A-T7, pMSCV-hiR2-FL-F523W-T7, pMSCV-hiR2-FL-F523A-T7, pMSCV-hiR2-FL-V524A-T7, pMSCV-hiR2-FL-K525A-T7, pMSCV-hiR2-FL-W526A-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q527P-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q527A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D528N-T7, pMSCV-hiR2-FL-D528I-T7, pMSCV-hiR2-FL-D528A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D529H-T7, pMSCV-hiR2-FL-D529A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T530P-T7, pMSCV-hiR2-FL-T530A-T7, pMSCV-hiR2-FL-G531S-T7, pMSCV-hiR2-FL-G531A-T7, pMSCV-hiR2-FL-P532A-T7, pMSCV-hiR2-FL-P533--T7, pMSCV-hiR2-FL-P533A-T7, pMSCV-hiR2-FL-M534S-T7, pMSCV-hiR2-FL-M534--T7, pMSCV-hiR2-FL-M534A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D535--T7, pMSCV-hiR2-FL-D535A-T7, pMSCV-hiR2-FL-K536--T7, pMSCV-hiR2-FL-K536A-T7, pMSCV-hiR2-FL-S537E-T7, pMSCV-hiR2-FL-S537A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D538L-T7, pMSCV-hiR2-FL-D538A-T7, pMSCV-hiR2-FL-L539A-T7, pMSCV-hiR2-FL-G540S-T7, pMSCV-hiR2-FL-G540A-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q541H-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q541A-T7, pMSCV-hiR2-FL-K542A-T7, pMSCV-hiR2-FL-R543Q-T7, pMSCV-hiR2-FL-R543A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T544P-T7, pMSCV-hiR2-FL-T544Q-T7, pMSCV-hiR2-FL-T544A-T7, pMSCV-hiR2-FL-S545F-T7, pMSCV-hiR2-FL-S545A-T7,

pMSCV-hiR2-FL-G546A-T7, pMSCV-hiR2-FL-A547V-T7, pMSCV-hiR2-FL-A547S-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-V548A-T7, pMSCV-hiR2-FL-C549A-T7, pMSCV-hiR2-FL-H550A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-Q551A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D552A-T7, pMSCV-hiR2-FL-P553A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-R554A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T555V-T7, pMSCV-hiR2-FL-T555A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-C556A-T7, pMSCV-hiR2-FL-E557D-T7, pMSCV-hiR2-FL-E557A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-E558A-T7, pMSCV-hiR2-FL-P559A-T7, pMSCV-hiR2-FL-A560S-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-S561A-T7, pMSCV-hiR2-FL-S562E-T7, pMSCV-hiR2-FL-S562A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-G563D-T7, pMSCV-hiR2-FL-G563A-T7, pMSCV-hiR2-FL-A564P-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-A564S-T7, pMSCV-hiR2-FL-H565A-T7, pMSCV-hiR2-FL-I566E-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-I566A-T7, pMSCV-hiR2-FL-W567A-T7, pMSCV-hiR2-FL-P568A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-D569E-T7, pMSCV-hiR2-FL-D569A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D570A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-I571A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T572A-T7, pMSCV-hiR2-FL-K573A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-W574A-T7, pMSCV-hiR2-FL-P575A-T7, pMSCV-hiR2-FL-I576A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-C577A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T578A-T7, pMSCV-hiR2-FL-E579K-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-E579A-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q580N-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q580A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-A581S-T7, pMSCV-hiR2-FL-R582A-T7, pMSCV-hiR2-FL-S583G-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-S583A-T7, pMSCV-hiR2-FL-N584A-T7, pMSCV-hiR2-FL-H585A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-T586A-T7, pMSCV-hiR2-FL-G587N-T7, pMSCV-hiR2-FL-G587A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-F588H-T7, pMSCV-hiR2-FL-F588A-T7, pMSCV-hiR2-FL-L589P-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-L589A-T7, pMSCV-hiR2-FL-H590A-T7, pMSCV-hiR2-FL-M591A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-D592A-T7, pMSCV-hiR2-FL-C593A-T7 и pMSCV-hiR2-FL-E594V-T7,
 кодирующих полноразмерный iRhom2 человека с единичными аминокислотными
 заменами, меченный на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа T7
 (MASMTGGQQMG), и хранили при 37°C, 5 % CO₂. Через 7 часов, трансфекции
 останавливали путем замены клеточных супернатантов стандартной питательной средой
 без хлорохина, и клетки инкубировали при 37°C, 5 % CO₂ с обеспечением продукции вируса
 в течение всей ночи. Параллельным образом, иммортализованные iRhom1/2-/- DKO MEF в
 качестве клеток-мишеней для ретровирусного заражения высевали на 6-луночные
 планшеты для тканевых культур (Greiner, Germany) в стандартной питательной среде при
 1×10⁵ клеток на лунку и также хранили всю ночь при 37°C, 5 % CO₂. В день 3, супернатанты
 клеток Phoenix-ECO, высвобождающих экотропный вирус pMSCV-hiR2-FL-Q502R-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-N503A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D504A-T7, pMSCV-hiR2-FL-H505R-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-H505A-T7, pMSCV-hiR2-FL-S506A-T7, pMSCV-hiR2-FL-G507A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-C508A-T7, pMSCV-hiR2-FL-I509V-T7, pMSCV-hiR2-FL-I509A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-Q510A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T511A-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q512L-T7,

pMSCV-hiR2-FL-Q512S-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q512A-T7, pMSCV-hiR2-FL-R513K-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-R513E-T7, pMSCV-hiR2-FL-R513A-T7, pMSCV-hiR2-FL-K514E-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-K514A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D515E-T7, pMSCV-hiR2-FL-D515A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-C516A-T7, pMSCV-hiR2-FL-S517A-T7, pMSCV-hiR2-FL-E518S-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-E518A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T519A-T7, pMSCV-hiR2-FL-L520A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-A521S-T7, pMSCV-hiR2-FL-T522V-T7, pMSCV-hiR2-FL-T522A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-F523W-T7, pMSCV-hiR2-FL-F523A-T7, pMSCV-hiR2-FL-V524A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-K525A-T7, pMSCV-hiR2-FL-W526A-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q527P-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-Q527A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D528N-T7, pMSCV-hiR2-FL-D528I-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-D528A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D529H-T7, pMSCV-hiR2-FL-D529A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-T530P-T7, pMSCV-hiR2-FL-T530A-T7, pMSCV-hiR2-FL-G531S-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-G531A-T7, pMSCV-hiR2-FL-P532A-T7, pMSCV-hiR2-FL-P533--T7,
 pMSCV-hiR2-FL-P533A-T7, pMSCV-hiR2-FL-M534S-T7, pMSCV-hiR2-FL-M534--T7,
 pMSCV-hiR2-FL-M534A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D535--T7, pMSCV-hiR2-FL-D535A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-K536--T7, pMSCV-hiR2-FL-K536A-T7, pMSCV-hiR2-FL-S537E-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-S537A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D538L-T7, pMSCV-hiR2-FL-D538A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-L539A-T7, pMSCV-hiR2-FL-G540S-T7, pMSCV-hiR2-FL-G540A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-Q541H-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q541A-T7, pMSCV-hiR2-FL-K542A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-R543Q-T7, pMSCV-hiR2-FL-R543A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T544P-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-T544Q-T7, pMSCV-hiR2-FL-T544A-T7, pMSCV-hiR2-FL-S545F-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-S545A-T7, pMSCV-hiR2-FL-G546A-T7, pMSCV-hiR2-FL-A547V-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-A547S-T7, pMSCV-hiR2-FL-V548A-T7, pMSCV-hiR2-FL-C549A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-H550A-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q551A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D552A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-P553A-T7, pMSCV-hiR2-FL-R554A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T555V-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-T555A-T7, pMSCV-hiR2-FL-C556A-T7, pMSCV-hiR2-FL-E557D-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-E557A-T7, pMSCV-hiR2-FL-E558A-T7, pMSCV-hiR2-FL-P559A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-A560S-T7, pMSCV-hiR2-FL-S561A-T7, pMSCV-hiR2-FL-S562E-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-S562A-T7, pMSCV-hiR2-FL-G563D-T7, pMSCV-hiR2-FL-G563A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-A564P-T7, pMSCV-hiR2-FL-A564S-T7, pMSCV-hiR2-FL-H565A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-I566E-T7, pMSCV-hiR2-FL-I566A-T7, pMSCV-hiR2-FL-W567A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-P568A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D569E-T7, pMSCV-hiR2-FL-D569A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-D570A-T7, pMSCV-hiR2-FL-I571A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T572A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-K573A-T7, pMSCV-hiR2-FL-W574A-T7, pMSCV-hiR2-FL-P575A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-I576A-T7, pMSCV-hiR2-FL-C577A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T578A-T7,
 pMSCV-hiR2-FL-E579K-T7, pMSCV-hiR2-FL-E579A-T7, pMSCV-hiR2-FL-Q580N-T7,

pMSCV-hiR2-FL-Q580A-T7, pMSCV-hiR2-FL-A581S-T7, pMSCV-hiR2-FL-R582A-T7,
pMSCV-hiR2-FL-S583G-T7, pMSCV-hiR2-FL-S583A-T7, pMSCV-hiR2-FL-N584A-T7,
pMSCV-hiR2-FL-H585A-T7, pMSCV-hiR2-FL-T586A-T7, pMSCV-hiR2-FL-G587N-T7,
pMSCV-hiR2-FL-G587A-T7, pMSCV-hiR2-FL-F588H-T7, pMSCV-hiR2-FL-F588A-T7,
pMSCV-hiR2-FL-L589P-T7, pMSCV-hiR2-FL-L589A-T7, pMSCV-hiR2-FL-H590A-T7,
pMSCV-hiR2-FL-M591A-T7, pMSCV-hiR2-FL-D592A-T7, pMSCV-hiR2-FL-C593A-T7 и
pMSCV-hiR2-FL-E594V-T7, собирали, фильтровали с помощью СА-фильтров 0,45 мкм и
добавляли 4 мкг/мл полибрена (Sigma-Aldrich, USA). После удаления среды из
иммортизированных iRhom1/2-/- DKO MEF, эти супернатанты добавляли к клеткам-
мишеням на 4 часа при 37°C, 5 % CO₂ для первого заражения. Одновременно Phoenix-ECO
клетки повторно инкубировали со свежей средой, которую еще через 4 часа фильтровали и
использовали для повторного заражения соответствующих популяций клеток-мишеней,
опять же в присутствии 4 мкг/мл полибрена. Подобным образом проводили третий, но
ночной цикл заражения. В день 4, супернатанты клеток, содержащие вирус, заменяли
свежей стандартной питательной средой. Начиная с дня 5 клетки выращивали в
присутствии 2 мг/мл генетицина (G418, Thermo Fisher Scientific, USA) для отбора
иммортизированных клеток MEF-DKO-hiR2-FL-Q502R-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-N503A-T7,
MEF-DKO-hiR2-FL-D504A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H505R-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H505A-
T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S506A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G507A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-
C508A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I509V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I509A-T7, MEF-DKO-hiR2-
FL-Q510A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T511A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512L-T7, MEF-DKO-
hiR2-FL-Q512S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513K-T7, MEF-
DKO-hiR2-FL-R513E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K514E-T7,
MEF-DKO-hiR2-FL-K514A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D515E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D515A-
T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C516A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S517A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-
E518S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E518A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T519A-T7, MEF-DKO-hiR2-
FL-L520A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A521S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T522V-T7, MEF-DKO-
hiR2-FL-T522A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F523W-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F523A-T7, MEF-
DKO-hiR2-FL-V524A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K525A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W526A-T7,
MEF-DKO-hiR2-FL-Q527P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q527A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528N-
T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528I-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-
D529H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D529A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T530P-T7, MEF-DKO-hiR2-
FL-T530A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G531S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G531A-T7, MEF-DKO-
hiR2-FL-P532A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P533A-T7, MEF-
DKO-hiR2-FL-M534S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534A-T7,

MEF-DKO-hiR2-FL-D535--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D535A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K536--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S537E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S537A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D538L-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D538A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G540S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G540A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q541H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q541A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K542A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R543Q-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R543A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544Q-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S545F-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S545A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A547V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-V548A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C549A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H550A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q551A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D552A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P553A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R554A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T555V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T555A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C556A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E557D-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E557A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E558A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P559A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S561A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S562E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S562A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G563D-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G563A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A564P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A564S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H565A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I566E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I566A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W567A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P568A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D569E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D569A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D570A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I571A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T572A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K573A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W574A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P575A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I576A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C577A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T578A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E579K-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E579A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q580N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q580A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A581S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R582A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S583G-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S583A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-N584A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H585A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T586A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G587N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G587A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F588H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F588A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L589P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L589A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H590A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M591A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D592A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C593A-T7 и MEF-DKO-hiR2-FL-E594V-T7, стабильно экспрессирующих полноразмерный iRhom2 человека с единичными аминокислотными заменами, меченный на С-конце тремя последовательными копиями эпитопа T7. После размножения клетки хранили для будущего использования.

Анализы FACS для валидации системы тестирования

Кратко, иммортализованные клетки MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7 и клетки MEF-DKO-hiR2-FL-Q502R-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-N503A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D504A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H505R-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H505A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S506A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G507A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C508A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I509V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I509A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q510A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T511A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512L-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513K-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K514E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K514A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D515E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D515A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C516A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S517A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E518S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E518A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T519A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L520A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A521S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T522V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T522A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F523W-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F523A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-V524A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K525A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W526A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q527P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q527A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528I-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D529H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D529A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T530P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T530A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G531S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G531A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P533A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D535--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D535A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K536--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S537E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S537A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D538L-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D538A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G540S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G540A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q541H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q541A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K542A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R543Q-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R543A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544Q-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S545F-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S545A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A547V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-V548A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C549A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H550A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q551A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D552A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P553A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R554A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T555V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T555A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C556A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E557D-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E557A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E558A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P559A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S561A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-

S562E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S562A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G563D-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G563A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A564P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A564S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H565A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I566E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I566A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W567A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P568A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D569E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D569A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D570A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I571A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T572A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K573A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W574A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P575A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I576A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C577A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T578A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E579K-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E579A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q580N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q580A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A581S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R582A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S583G-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S583A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-N584A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H585A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T586A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G587N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G587A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F588H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F588A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L589P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L589A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H590A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M591A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D592A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C593A-T7 и MEF-DKO-hiR2-FL-E594V-T7 собирали с 10 мМ EDTA в PBS, промывали и ресуспендировали в буфере FACS (PBS, 3 % FBS, 0,05 % азида натрия), и высевали в 96-луночные планшеты Nunc с U-образным дном (Thermo Fisher Scientific, USA) при приблизительно 1×10^5 клеток на лунку. Для осаждения клеток и удаления супернатантов планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут. Для первичного окрашивания клетки ресуспендировали в 100 мкл на лунку либо только в буфере FACS (контроли), либо мышиного моноклонального анти-T7 IgG (Merck Millipore, USA) при 3 мкг/мл буфера FACS и инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут и промывали дважды с 200 мкл на лунку буфера FACS. Для вторичного окрашивания клетки центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл на лунку фрагмента обнаружения PE-конъюгированного козьего анти-мышиного IgG F(ab')₂ (Dianova, Germany), разведенного 1:100 в буфере FACS. Защищенные от света клеточные суспензии инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут и промывали три раза с 200 мкл на лунку буфера FACS. Наконец, клетки ресуспендировали в 150 мкл на лунку буфера FACS и анализировали с помощью проточного цитометра BD Accuri™ C6 Plus (Becton Dickinson, Germany).

На фиг. 16а показаны репрезентативные результаты этого эксперимента на примере человеческого варианта iRhom2 hiR2-FL-K536A-T7. Анализ связывания анти-T7 меченного антитела (черный) и анти-мышиный IgG вторичного антитела (серый) на клетках MEF-

DKO-hiR2-FL-WT-T7 (слева) и клетках MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7 (справа) выявил сильное увеличение относительной интенсивности флуоресценции. Это показывает, что, подобно iRhom2 человека дикого типа (слева), вариант iRhom2 человека hiR2-FL-K536A-T7 хорошо экспрессируется и локализуется на поверхности этих клеток (справа). Подобные результаты были получены для экспрессии и локализации полноразмерного iRhom2 человека с единичными аминокислотными заменами, экспрессируемого на клетках MEF-DKO-hiR2-FL-Q502R-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-N503A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D504A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H505R-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H505A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S506A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G507A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C508A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I509V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I509A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q510A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T511A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512L-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513K-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K514E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K514A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D515E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D515A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C516A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S517A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E518S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E518A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T519A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L520A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A521S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T522V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T522A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F523W-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F523A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-V524A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K525A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W526A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q527P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q527A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528I-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D529H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D529A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T530P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T530A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G531S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G531A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P533A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D535--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D535A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K536--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S537E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S537A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D538L-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D538A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G540S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G540A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q541H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q541A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K542A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R543Q-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R543A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544Q-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S545F-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S545A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A547V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-V548A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C549A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H550A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q551A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D552A-T7, MEF-DKO-

hiR2-FL-P553A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R554A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T555V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T555A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C556A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E557D-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E557A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E558A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P559A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S561A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S562E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S562A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G563D-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G563A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A564P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A564S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H565A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I566E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I566A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W567A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P568A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D569E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D569A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D570A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I571A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T572A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K573A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W574A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P575A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I576A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C577A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T578A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E579K-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E579A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q580N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q580A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A581S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R582A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S583G-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S583A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-N584A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H585A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T586A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G587N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G587A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F588H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F588A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L589P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L589A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H590A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M591A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D592A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C593A-T7 и MEF-DKO-hiR2-FL-E594V-T7.

ELISA TGF α для валидации системы тестирования

Для тестирования всех 137 вариантов iRhom2 человека с единичными аминокислотными заменами или делециями, соответствующие клеточные линии MEF-DKO, стабильно экспрессирующих эти варианты, созданные, как описано в примере выше, подвергали анализу ELISA шеддинга TGF α . Для того, чтобы продемонстрировать функциональность всех вариантов в качестве индикатора того, что эти варианты правильно уложены, оценивали РМА-индуцированное высвобождение нуклеофицированного TGF α . Поскольку клетки, использованные в этом анализе, представляют собой выявленные варианты мышинных эмбриональных фибробластов с двойным нокаутом iRhom1/2/-/ (описанных в примере 2), которые выявлены соответствующим человеческим вариантом iRhom2 с единственной аминокислотной заменой или делецией, стабильно экспрессируемый вариант iRhom2 представляет собой единственный белок iRhom, вообще

экспрессируемый в этих клетках, и, следовательно, единственный iRhom, вносящий вклад в шеддинг TGF α в этих клетках.

Кратко, в день 1, черный 96-луночный планшет Nunc MaxiSorp® (Thermo Fisher Scientific, USA) покрывали всю ночь с 100 мкл на лунку мышиноного анти-человеческий TGF α захватывающего антитела (представлен как часть набора DuoSet ELISA) при 400 нг/мл в TBS при 4°C. После того, как клетки MEF-DKO-hiR2-FL-Q502R-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-N503A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D504A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H505R-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H505A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S506A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G507A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C508A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I509V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I509A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q510A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T511A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512L-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513K-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K514E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K514A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D515E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D515A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C516A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S517A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E518S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E518A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T519A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L520A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A521S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T522V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T522A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F523W-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F523A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-V524A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K525A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W526A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q527P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q527A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528I-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D529H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D529A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T530P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T530A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G531S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G531A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P533A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D535--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D535A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K536--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S537E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S537A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D538L-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D538A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G540S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G540A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q541H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q541A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K542A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R543Q-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R543A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544Q-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S545F-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S545A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A547V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-V548A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C549A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H550A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q551A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D552A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P553A-T7, MEF-DKO-

hiR2-FL-R554A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T555V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T555A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C556A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E557D-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E557A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E558A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P559A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S561A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S562E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S562A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G563D-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G563A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A564P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A564S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H565A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I566E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I566A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W567A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P568A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D569E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D569A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D570A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I571A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T572A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K573A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W574A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P575A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I576A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C577A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T578A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E579K-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E579A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q580N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q580A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A581S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R582A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S583G-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S583A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-N584A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H585A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T586A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G587N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G587A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F588H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F588A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L589P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L589A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H590A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M591A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D592A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C593A-T7 и MEF-DKO-hiR2-FL-E594V-T7 подвергли электропорации конструкцией hTGF α -FL-WT в основной цепи вектора pcDNA3.1 с использованием 4D-Nucleofector System (Lonza, Switzerland), приблизительно 33000 клеток MEF-DKO, несущих вариант iRhom2 человека с единичной аминокислотной заменой или делецией, высевали в 100 мкл нормальной питательной среды в каждую лунку 96-луночных культуральных планшетов с F-образным дном (Thermo Fisher Scientific, USA). В день 2 раствор захватывающих антител удаляли и планшеты MaxiSorp® блокировали с 300 мкл на лунку TBS, 1% BSA при комнатной температуре в течение по меньшей мере 1 часа. При этом клетки однократно промывали PBS, а затем добавляли по 80 мкл среды OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, USA) на лунку.

Затем клетки (кроме нестимулированных контролей) стимулировали 20 мкл на лунку PMA (Sigma-Aldrich, USA) при конечной концентрации 25 нг/мл при 37°C, 5 % CO₂ в течение 1 часа. 20 мкл среды OptiMEM добавляли к нестимулированным контрольным клеткам. После этого 96-луночные планшеты центрифугировали для получения осадка клеток. Параллельным образом, с планшетов MaxiSorp® удаляли блокирующий буфер и промывали планшеты 4 раза по 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland). Для того, чтобы

избежать высыхания, в каждую лунку планшетов MaxiSorp® немедленно добавляли 30 мкл TBS с последующим переносом 70 мкл бесклеточного супернатанта на образец. После этого на лунку добавляли 100 мкл биотинилированного козьего анти-человеческий TGF α антитела обнаружения (представленного как часть набора DuoSet ELISA) в концентрации 37,5 нг/мл в TBS, и планшеты, защищенные от прямого света, инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После 4 промывок по 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл стрептавидина-AP (R&D Systems, USA), разведенного 1:10000 в TBS добавляли в каждую лунку и, снова, защищая от прямого света, планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После еще одного раунда из 4 промывок 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, добавляли 100 мкл раствора субстрата AttoPhos (Promega, USA) на лунку для инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа. С помощью устройства для чтения микропланшетов Infinity M1000 (Tecan Group, Switzerland) регистрировали флуоресценцию каждой лунки при длине волны возбуждения 435 нм и длине волны испускания 555 нм.

На фиг. 16b показаны результаты анализов высвобождения эти анализы высвобождения TGF α , демонстрирующие, что 128 из 137 вариантов iRhom2 человека с единичными аминокислотными заменами или делециями являются функционально активными, так как шеддинг TGF α может быть индуцирован PMA, что указывает на то, что эти варианты имеют правильную укладку, в отличие от популяция отрицательного контроля с электропорацией пустого вектора (Mock), где не обнаруживается PMA-индуцированный шеддинг TGF α . Варианты iRhom2 человека hiR2-FL-C516A-T7, hiR2-FL-F523A-T7, hiR2-FL-C549A-T7, hiR2-FL-D552A-T7, hiR2-FL-C556A-T7, hiR2-FL-P559A-T7, hiR2-FL-W567A-T7, hiR2-FL-W574A-T7 и hiR2-FL-C577A-T7 не показали или почти не показали функциональности и поэтому были исключены из дальнейшего анализа.

Анализы FACS для определения характеристик связывания очищенных антител согласно настоящему изобретению с целью картирования эпитопов

Кратко, иммортализованные клетки MEF-DKO-hiR2-FL-Q502R-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-N503A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D504A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H505R-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H505A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S506A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G507A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C508A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I509V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I509A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q510A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T511A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-

Q512L-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q512A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513K-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R513A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K514E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K514A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D515E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D515A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C516A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S517A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E518S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E518A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T519A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L520A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A521S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T522V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T522A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F523W-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F523A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-V524A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K525A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W526A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q527P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q527A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528I-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D528A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D529H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D529A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T530P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T530A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G531S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G531A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P533A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M534A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D535--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D535A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K536--T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S537E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S537A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D538L-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D538A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G540S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G540A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q541H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q541A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K542A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R543Q-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R543A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544Q-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T544A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S545F-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S545A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A547V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-V548A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C549A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H550A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q551A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D552A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P553A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R554A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T555V-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T555A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C556A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E557D-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E557A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E558A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P559A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S561A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S562E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S562A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G563D-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G563A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A564P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A564S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H565A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I566E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I566A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W567A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-P568A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D569E-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D569A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D570A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I571A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T572A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-K573A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-W574A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-

P575A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-I576A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C577A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T578A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E579K-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-E579A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q580N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-Q580A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-A581S-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-R582A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S583G-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-S583A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-N584A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H585A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-T586A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G587N-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-G587A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F588H-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-F588A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L589P-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-L589A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-H590A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-M591A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-D592A-T7, MEF-DKO-hiR2-FL-C593A-T7 и MEF-DKO-hiR2-FL-E594V-T7 собирали с 10 mM EDTA в PBS, промывали и ресуспендировали в буфере FACS (PBS, 3 % FBS, 0,05 % азида натрия), и высевали в 96-луночные планшеты Nunc с U-образным дном (Thermo Fisher Scientific, USA) при приблизительно 1×10^5 клеток на лунку. Для осаждения клеток и удаления супернатантов планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут. Для первичного окрашивания клетки ресуспендировали в 100 мкл на лунку либо только в буфере FACS (контроли), либо гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению при 3 мкг/мл в буфере FACS и инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут и промывали дважды с 200 мкл на лунку буфера FACS. Для вторичного окрашивания клетки центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл на лунку фрагмента обнаружения PE-конъюгированного козьего анти-человеческий IgG F(ab')₂ (Dianova, Germany), разведенного 1:100 в буфере FACS. Защищенные от света клеточные суспензии инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту и 4°C в течение 3 минут и промывали три раза с 200 мкл на лунку буфера FACS. Наконец, клетки ресуспендировали в 150 мкл на лунку буфера FACS и анализировали с помощью проточного цитометра BD Accuri™ C6 Plus (Becton Dickinson, Germany).

На фиг. 17а показаны репрезентативные результаты этого эксперимента. Например, для всей панели из 128 функциональных вариантов iRhom2 человека с единичными аминокислотными заменами или делециями показаны данные анализа клеток, экспрессирующих вариант iRhom2 человека hiR2-FL-K536A-T7. Анализы связывания гуманизированного антитела 42-B-02 в качестве иллюстративного примера антител согласно настоящему изобретению (черный), а также анти-мышиный IgG вторичное антитело (серый) на клетках MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7 (слева) и клетках MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7 (справа) демонстрируют, что замена единственной аминокислоты лизина 536

в iRhom2 человека на аланин сильно влияет и, таким образом, способствует связыванию гуманизированного антитела 42-B-02 согласно настоящему изобретению (справа). Связывание с клетками MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7 (слева) служит положительным контролем для гуманизированного антитела 42-B-02.

На фиг. 17b в дополнение к фиг. 17a обобщены результаты анализов FACS гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению на всей панели из 128 сконструированных функциональных популяций MEF, экспрессирующих варианты iRhom2 человека с единичными аминокислотными заменами или делециями. Связывание каждого антитела с iRhom2 человека дикого типа считают как 100 процентов. Соответствующее падение связывания антитела с любым вариантом на 30–59 % показано клетками, окрашенными в светло-серый цвет (и отмеченными «1»), ухудшение связывания на 60–95 % показано клетками, окрашенными в серый цвет (и отмеченными «2»), а потеря связывания на $\geq 95\%$ показано клетками, окрашенными в темно-серый цвет (и отмеченными «3»). Эти данные раскрывают родственные паттерны положений аминокислот, релевантных для связывания гуманизированных 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению.

Пример 15. Анализ ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на LPS-индуцированный шеддинг TNF α в первичном человеческом материале, полученном у здоровых доноров *in vitro*

В следующем исследовании анализы высвобождения TNF α на основе ELISA проводили для анализа ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на LPS-индуцированное высвобождение эндогенного TNF α из первичного материала, полученного у здоровых доноров, с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

Анализ высвобождения TNF α на основе ELISA, который использовали в этом примере, описан ниже.

Кратко, в день 1 черные 96-луночные планшеты Nunc MaxiSorp® (Thermo Fisher Scientific, USA) покрывали на всю ночь с 100 мкл на лунку мышиноного анти-человеческий TNF α захватывающего антитела (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 4 мкг/мл TBS при 4°C. В день 2 раствор захватывающего антитела удаляли и планшеты MaxiSorp® блокировали с 300 мкл на лунку TBS, 1 % BSA при комнатной температуре в течение 3 часов. Между тем, 20000 клеток PBMC от здоровых доноров (ReachBio Research Labs, USA) в 80 мкл нормальной питательной среды высевали в каждую лунку 96-луночных

планшетов Greiner CELLSTAR с V-образным дном (Greiner Bio-One, Germany) и предварительно инкубировали с 20 мкл на лунку стандартной питательной среды с добавлением батимастата (BB94, Abcam, UK) при 50 мкМ в качестве положительного контроля (для конечной концентрации 10 мкМ в результирующем объеме образца 100 мкл), человеческого IgG 1 каппа антитела (BioLegend, USA) при 15 мкг/мл в качестве изотипического контроля (для конечной концентрации 3 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) или антител согласно настоящему изобретению при 15 мкг/мл (для конечной концентрации 3 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) при 37°C, 5 % CO₂ в течение 30 минут. В случае контролей стимуляции 20 мкл стандартной питательной среды без тестируемых образцов добавляли. Затем клетки (за исключением клеток для нестимулированных контролей) стимулировали с 20 мкл на лунку LPS (Sigma-Aldrich, USA) при 0,06 нг/мл в питательной среде для конечной концентрации 0,01 нг/мл при 37°C, 5 % CO₂ в течение 2 часов. После этого 96-луночные планшеты центрифугировали для осаждения клеток. Параллельным образом, блокирующий буфер удаляли с планшетов MaxiSorp® и планшеты промывали 4 раза с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland). Для того, чтобы избежать высыхания, 30 мкл TBS добавляли в каждую лунку планшетов MaxiSorp® немедленно, с последующим переносом 70 мкл бесклеточного супернатанта на образец. Дополнительно, 100 мкл рекомбинантного человеческого белка TNF α (представленного как часть набора DuoSet ELISA), разведенного в TBS в определенных концентрациях, добавляли на планшет в качестве стандартных эталонов. После этого 100 мкл биотинилированного козьего анти-человеческий TNF α антитела обнаружения (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 50 нг/мл TBS добавляли на лунку, и защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл стрептавидин-AP (R&D Systems, USA), разведенный 1:10000 в TBS, добавляли в каждую лунку, и снова защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После другого раунда из четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл раствора субстрата AttoPhos (Promega, USA) на лунку добавляли для инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа. С помощью устройства для чтения микропланшетов Infinity M1000 (Tecan Group, Switzerland) регистрировали

флуоресценцию каждой лунки при длине волны возбуждения 435 нм и длине волны испускания 555 нм.

На фиг. 18 показаны репрезентативные результаты этого эксперимента, демонстрирующие влияние тестируемого образца на LPS-индуцированное высвобождение TNF α из PBMC от здоровых доноров в абсолютных количествах (на фиг. 18a) и проценте ингибирования (на фиг. 18b). В то время как батимастат (BB94) в качестве низкомолекулярного ингибитора металлопротеиназ служит в качестве положительного контроля и приводит к 98,9 % ингибированию LPS-индуцированного высвобождения TNF α , присутствие изотипического контроля IgG не оказало существенного влияния на шеддинг TNF α . Напротив, равная концентрация гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению ингибируют LPS-индуцированное высвобождение TNF α из PBMC от здоровых доноров на 74,2 %, 73,5 %, 72,8 %, 59,4 %, 64,3 % и 68,5 %, соответственно.

Пример 16. Анализ ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на PMA-индуцированный шеддинг IL-6R в первичном материале человека, полученном от здоровых доноров *in vitro*

В следующем исследовании анализы высвобождения IL-6R на основе ELISA проводили для анализа ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на PMA-индуцированное высвобождение эндогенного IL-6R из первичного человеческого материала, полученного от здоровых доноров с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

Анализ высвобождения IL-6R на основе ELISA, который использовали в этом примере, описан ниже.

Кратко, в день 1 черные 96-луночные планшеты Nunc MaxiSorp® (Thermo Fisher Scientific, USA) покрывали на всю ночь с 100 мкл на лунку мышинового анти-человеческий IL-6R захватывающего антитела (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 2 мкг/мл TBS при 4°C.

40000 клеток PBMC от здоровых доноров (STEMCELL Technologies, Canada) в 80 мкл нормальной питательной среды высевали в каждую лунку 96-луночных планшетов Greiner CELLSTAR с V-образным дном (Greiner Bio-One, Germany) и предварительно инкубировали с 20 мкл на лунку стандартной питательной среды с добавлением батимастата (BB94, Abcam, UK) при 50 мкМ в качестве положительного контроля (для конечной концентрации 10 мкМ в результирующем объеме образца 100 мкл), человеческого IgG 1 каппа антитела (BioLegend, USA) при 15 мкг/мл в качестве

изотипического контроля (для конечной концентрации 3 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) или антител согласно настоящему изобретению при 15 мкг/мл (для конечной концентрации 3 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) при 37°C, 5 % CO₂ в течение 30 минут. В случае контролей стимуляции 20 мкл стандартной питательной среды без тестируемых образцов добавляли. Затем клетки (за исключением клеток для нестимулированных контролей) стимулировали с 20 мкл на лунку PMA (Sigma-Aldrich, USA) при 150 нг/мл в питательной среде для конечной концентрации 25 нг/мл при 37°C, 5 % CO₂ в течение 24 часов.

В день 2 раствор захватывающего антитела удаляли и планшеты MaxiSorp® блокировали с 300 мкл на лунку TBS, 1 % BSA при комнатной температуре в течение 2 часов.

Между тем, 96-луночные планшеты центрифугировали для осаждения клеток. Параллельным образом, блокирующий буфер удаляли с планшетов MaxiSorp® и планшеты промывали 4 раза с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland). Для того, чтобы избежать высыхания, 30 мкл TBS добавляли в каждую лунку планшетов MaxiSorp® немедленно, с последующим переносом 70 мкл бесклеточного супернатанта на образец. Дополнительно, 100 мкл рекомбинантного человеческого белка IL-6R (представленного как часть набора DuoSet ELISA), разведенного в TBS в определенных концентрациях, добавляли на планшет в качестве стандартных эталонов. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл биотинилированного козьего анти-человеческий IL-6R антитела обнаружения (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 100 нг/мл TBS добавляли на лунку, и защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл стрептавидин-AP (R&D Systems, USA), разведенный 1:10000 в TBS, добавляли в каждую лунку, и снова защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После другого раунда из четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл раствора субстрата AttoPhos (Promega, USA) на лунку добавляли для инкубации в темноте

при комнатной температуре в течение 1 часа. С помощью устройства для чтения микропланшетов Infinity M1000 (Tecan Group, Switzerland) регистрировали флуоресценцию каждой лунки при длине волны возбуждения 435 нм и длине волны испускания 555 нм.

На фиг. 19 показаны репрезентативные результаты этого эксперимента, демонстрирующие влияние тестируемого образца на РМА-индуцированное высвобождение IL-6R из PBMC от здоровых доноров в абсолютных количествах (на фиг. 19a) и проценте ингибирования (на фиг. 19b). В то время как батимастат (BB94) в качестве низкомолекулярного ингибитора металлопротеиназ служит в качестве положительного контроля и приводит к 96,2 % ингибированию РМА-индуцированного высвобождения IL-6R, присутствие изотипического контроля IgG не оказало существенного влияния на шеддинг IL-6R. Напротив, равная концентрация гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению ингибирует РМА-индуцированное высвобождение IL-6R из PBMC от здоровых доноров на 75,0 %, 79,0 %, 75,4 %, 64,6 %, 73,4 % и 78,4 %, соответственно.

Пример 17. Анализ ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на РМА-индуцированный шеддинг HB-EGF в первичном материале человека, полученном от здоровых доноров *in vitro*

В следующем исследовании проводили анализы высвобождения HB-EGF на основе ELISA для анализа ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на РМА-индуцированное высвобождение эндогенного HB-EGF из первичного человеческого материала, полученного от здоровых доноров с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

Анализ высвобождения HB-EGF на основе ELISA, который использовали в этом примере, описан ниже.

Кратко, в день 1 черные 96-луночные планшеты Nunc MaxiSorp® (Thermo Fisher Scientific, USA) покрывали на всю ночь с 100 мкл на лунку мышиного анти-человеческий HB-EGF захватывающего антитела (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 2 мкг/мл TBS при 4°C.

80000 клеток PBMC от здоровых доноров (STEMCELL Technologies, Canada) в 80 мкл нормальной питательной среды высевали в каждую лунку 96-луночных планшетов Greiner CELLSTAR с V-образным дном (Greiner Bio-One, Germany) и предварительно инкубировали с 20 мкл на лунку стандартной питательной среды с добавлением батимастата (BB94, Abcam, UK) при 50 мкМ в качестве положительного контроля (для конечной концентрации 10 мкМ в результирующем объеме образца 100 мкл),

человеческого IgG антитела (BioLegend, USA) при 15 мкг/мл в качестве изотипического контроля (для конечной концентрации 3 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) или антител согласно настоящему изобретению при 15 мкг/мл (для конечной концентрации 3 мкг/мл в результирующем объеме образца 100 мкл) при 37°C, 5 % CO₂ в течение 30 минут. В случае контролей стимуляции 20 мкл стандартной питательной среды без тестируемых образцов добавляли. Затем клетки (за исключением клеток для нестимулированных контролей) стимулировали с 20 мкл на лунку PMA (Sigma-Aldrich, USA) при 150 нг/мл в питательной среде для конечной концентрации 25 нг/мл при 37°C, 5 % CO₂ в течение 24 часов. В день 2 раствор захватывающего антитела удаляли и планшеты MaxiSorp® блокировали с 300 мкл на лунку TBS, 1 % BSA при комнатной температуре в течение 2 часов.

Между тем, 96-луночные планшеты центрифугировали для осаждения клеток. Параллельным образом, блокирующий буфер удаляли с планшетов MaxiSorp® и планшеты промывали 4 раза с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland). Для того, чтобы избежать высыхания, 30 мкл TBS добавляли в каждую лунку планшетов MaxiSorp® немедленно, с последующим переносом 70 мкл бесклеточного супернатанта на образец. Дополнительно, 100 мкл рекомбинантного человеческого белка HB-EGF (представленного как часть набора DuoSet ELISA), разведенного в TBS в определенных концентрациях, добавляли на планшет в качестве стандартных эталонов. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл биотинилированного козьего анти-человеческий HB-EGF антитела обнаружения (представленного как часть набора DuoSet ELISA) при 50 нг/мл TBS добавляли на лунку, и защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов.

После четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл стрептавидин-AP (R&D Systems, USA), разведенный 1:10000 в TBS, добавляли в каждую лунку, и снова защищенные от прямого света планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После другого раунда из четырех промывок с 350 мкл TBS-T (Carl Roth, Germany) на лунку на 96-головном устройстве для промывки планшета (Tecan Group, Switzerland) и тщательного удаления всех следов буфера после четвертого цикла, 100 мкл

раствора субстрата AttoPhos (Promega, USA) на лунку добавляли для инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа. С помощью устройства для чтения микропланшетов Infinity M1000 (Tecan Group, Switzerland) регистрировали флуоресценцию каждой лунки при длине волны возбуждения 435 нм и длине волны испускания 555 нм.

На фиг. 20 показаны репрезентативные результаты этого эксперимента, демонстрирующие влияние тестируемого образца на РМА-индуцированное высвобождение НВ-EGF из РВМС от здоровых доноров в абсолютных количествах (на фиг. 20a) и проценте ингибирования (на фиг. 20b). В то время как батимастат (BB94) в качестве низкомолекулярного ингибитора металлопротеиназ служит в качестве положительного контроля и приводит к 100,0 % ингибированию РМА-индуцированного высвобождения НВ-EGF, присутствие изотипического контроля IgG не оказало существенного влияния на шеддинг НВ-EGF. Напротив, равная концентрация гуманизированных антител 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и 42-B-04 согласно настоящему изобретению ингибирует РМА-индуцированное высвобождение НВ-EGF из РВМС от здоровых доноров на 69,7 %, 74,8 %, 66,5 %, 49,6 %, 59,2 % и 66,7 %, соответственно.

Пример 18. Анализ ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на LPS-индуцированный шеддинг TNF α in vivo

В следующем исследовании анализы высвобождения TNF α на основе ELISA проводили для исследования ингибирующего действия антител согласно настоящему изобретению на LPS-индуцированное высвобождение эндогенного TNF α на мышинной модели септического шока. Эксперимент проводили с использованием генетически гуманизированных мышей, у которых части мышинной геномной ДНК iRhom2 (экзоны, кодирующие сайт связывания антитела) были заменены соответствующими последовательностями геномной ДНК человека. Все эксперименты на животных были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных Специализированного центра хирургии и медицины Уэйла Корнелла.

В день 1 одной группе мышей вводили антитела согласно настоящему изобретению в концентрации 250 мкг/кг в 200 мкл PBS. Второй группе вводили только тот же объем PBS (200 мкл PBS на мышшь). Через 1 ч всем мышам вводили LPS (Sigma, USA) в концентрации 50 мкг/200 мкл на мышшь (250 нг/мкл). За всеми мышами внимательно наблюдали, и через 2 часа их усыпляли ингаляцией CO₂. Кровь отбирали из грудной полости и центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин при комнатной температуре для удаления клеток и дебриса. Чистую сыворотку переносили в новую пробирку и затем разводили при 1:10 в PBS для измерений ELISA.

Для измерения высвобождения TNF α , применяли набор Mouse TNF- α Uncoated ELISA (Invitrogen, USA). Кратко, в день 1 96-луночные планшеты Costar® (Corning, USA) покрывали на всю ночь с 100 мкл на лунку анти-мышиный TNF α захватывающего антитела (представленного как часть набора ELISA) при 1:250 в PBS при 4°C. В день 2 раствор захватывающего антитела удаляли, планшеты Costar® промывали три раза с 250 мкл PBS-Tween 0,05% (Boston Bio, USA) на лунку на устройстве для промывки планшета Nunc Immunowash (VWR, USA) и планшеты блокировали в течение 1 часа с 150 мкл разбавителя ELISA/ELISPOT (1X) (представлен как часть набора). Затем блокирующий буфер удалял с планшетов Costar® и планшеты промывали три раза с 250 мкл PBS-Tween 0,05% (Boston Bio, USA) на лунку на устройстве на промывки планшета Nunc Immunowash (VWR, USA). Сразу после этого 20 мкл биотинилированного анти-мышиного TNF α антитела обнаружения (представленного как часть набора ELISA) при конечном разведении 1:250 в разбавителе ELISA/ELISPOT добавляли во все лунки. Затем 80 мкл либо чистой, либо 1:10 разведенной сыворотки, либо стандартного эталона 80мкл рекомбинантного мышинного белка TNF α (представленного как часть набора ELISA), разведенного в разбавителе ELISA/ELISPOT при определенных концентрациях, добавляли на планшет. Образцы, стандарты и антитела обнаружения инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. После трех промывок по 250 мкл PBS-Tween 0,05% (Boston Bio, USA) на лунку с помощью устройства для промывки планшета Nunc Immunowash (VWR, USA) и тщательного удаления всех следов буфера после третьего цикла, 100 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена (представленного как часть набора ELISA), разведенного 1:100 в разбавителе ELISA/ELISPOT, добавляли в каждую лунку, и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После еще одного раунда из трех промывок по 250 мкл PBS-Tween 0,05% (Boston Bio, USA) на лунку на устройстве для промывки планшета Nunc Immunowash (VWR, USA) и тщательного удаления всех следов буфера после третьего цикла, 100 мкл раствора субстрата TMB (BD, USA) на лунку добавляли для инкубации в течение 15 минут. Цветную реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 н. серной кислоты (Sigma, USA) и планшет ELISA считывали при длине волны 450 нм с помощью планшетного ридера Multiskan Titertek (VWR, USA).

На фиг. 21 показаны репрезентативные результаты этого эксперимента, демонстрирующие влияние тестируемого образца на LPS-индуцированное высвобождение TNF α в сыворотке генетически гуманизированных мышей в абсолютных количествах (на фиг. 21a) и проценте высвобождения (на фиг. 21b). По сравнению с LPS-индуцированным высвобождением TNF α в сыворотке генетически гуманизированных мышей, которое было установлено как 100%, гуманизированное антитело 42-B-02 в качестве иллюстративного

примера антител согласно настоящему изобретению привело к LPS-индуцированному высвобождению TNF α в сыворотке генетически гуманизированных мышей, равному 17,3 %.

Ссылочные источники

- Köhler, G. & Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: Nature. Bd. 256, S. 495–497. Jonsson and Malmquist, Advances in Biosensors, 2:291-336 (1992)
- Wu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:6037-6042 (1998)
- Banik, SSR; Doranz, BJ (2010). "Mapping complex antibody epitopes". Genetic Engineering & Biotechnology News. 3 (2): 25–8
- DeLisser, HM (1999). Epitope mapping. Methods Mol Biol. 96. pp. 11–20
- Finco et al, Comparison of competitive ligand-binding assay and bioassay formats for the measurement of neutralizing antibodies to protein therapeutics. J Pharm Biomed Anal. 2011 Jan 25;54(2):351-8.
- Deng et al., Enhancing antibody patent protection using epitope mapping information MAbs. 2018 Feb-Mar; 10(2): 204–209
- Huston et al., Cell Biophysics, 22:189-224 (1993);
- Plückthun and Skerra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989) и в Day, E. D., Advanced Immunochemistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. (1990)
- Harding, The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. MAbs. 2010 May-Jun; 2(3): 256–265.
- Eylestein, et al, Molecular basis of in vitro affinity maturation and functional evolution of a neutralizing anti-human GM-CSF antibody, mAbs, 8:1, 176-186 (2016)
- Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991)
- Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)
- MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)
- Paul Baran et al, Biol Chem. 2013 May 24; 288(21): 14756–14768.

Последовательности

Следующие последовательности составляют часть раскрытия настоящей заявки. Электронный перечень последовательностей, совместимый со стандартом WIPO ST 25, также предоставлен вместе с этим приложением. Во избежание сомнений, если существуют

расхождения между последовательностями в следующей таблице и электронным перечнем последовательностей, последовательности в этой таблице будут считаться правильными.

SEQ ID No	Клон №	Тип	Аминокислотная последовательность
1	16-B-03	HCVD	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFALGVGWIRQ PPGKALEWLAHIWWDDDKYYPALKSRLTISKDTSKNQV VLTITNMDPVDTATYYCARITTYYYGMDYWGQGLVTVS S
2		HCDR1	TFALGVG
3		HCDR2	HIWWDDDKYYPALKS
4		HCDR3	ITTYYYGMDY
5		LCVD	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGNHLHWYQQKP DASPILLIKYASQSIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAED AATYFCQQSYQWPLTFGQGTKLEIK
6		LCDR1	RASQSIGNHLH
7		LCDR2	YASQSIG
8		LCDR3	QQSYQWPLT
9	16-B-05	HCVD	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFALGVGWIRQ PPGKALEWLAHIWWDEDKYYPALKSRLTISKDTSKNQV VLTITNMDPVDTATYYCARITTYYYGMDYWGQGLVTVS S
10		HCDR1	TFALGVG
11		HCDR2	HIWWDEDKYYPALKS
12		HCDR3	ITTYYYGMDY
13		LCVD	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGNHLHWYQQKP DASPILLIKYASQSIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAED AATYFCQQSYNWPLTFGQGTKLEIK
14		LCDR1	RASQSIGNHLH
15		LCDR2	YASQSIG
16		LCDR3	QQSYNWPLT
17	16-B-07	HCVD	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFALGVGWIRQ PPGKALEWLAHIWWDEDKYYPALKSRLTISKDTSKNQV VLTITNMDPVDTATYYCARITTYYYGMDYWGQGLVTVS S
18		HCDR1	TFALGVG
19		HCDR2	HIWWDEDKYYPALKS
20		HCDR3	ITTYYYGMDY
21		LCVD	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGNHLHWYQQKP DASPILLIKYASQSIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAED AATYFCQQSYQWPLTFGQGTKLEIK

22		LCDR1	RASQSIGNHLH	
23		LCDR2	YASQSI	
24		LCDR3	QQSYQWPLT	
25	23-B-04	HCDV	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFGMGVGVWIRQ PPGKALEWLAHIWWDDEKYYNSALKSRLTISKDTSKNQV VLTITNMDPVDATATYYCARISNYGSNYWYFNVWGGQTLV TVSS	
26		HCDR1	TFGMGVG	
27		HCDR2	HIWWDDEKYYNSALKS	
28		HCDR3	ISNYGSNYWYFNV	
29		LCVD	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMYWYQQKPG KAPKVLIIYDTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDF ATYYCQQWNAAYPLTFGQGTKLEIK	
30		LCDR1	RASSSVSYMY	
31		LCDR2	DTSNLAS	
32		LCDR3	QQWNAAYPLT	
33		42-B-02	HCDV	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFGRGVGVWIRQ PPGKALEWLAHIWWDDEKYYNSALKSRLTISKDTSKNQV VLTITNMDPVDATATYYCARIQNYGSNYWYFDVWGGQTL VTVSS
34			HCDR1	TFGRGVG
35	HCDR2		HIWWDDEKYYNSALKS	
36	HCDR3		IQNYGSNYWYFDV	
37	LCVD		AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSRISYMFYQQKPGK APKVLIIYDTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFA TYYCQQWNSYPLTFGQGTKLEIK	
38	LCDR1		RASSRISYMF	
39	LCDR2		DTSNLAS	
40	LCDR3		QQWNSYPLT	
41	42-B-04	HCDV	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFGRGVGVWIRQ PPGKALEWLAHIWWDDEKYYNSALKSRLTISKDTSKNQV VLTITNMDPVDATATYYCARIQNYGSNYWYFDVWGGQTL VTVSS	
42		HCDR1	TFGRGVG	
43		HCDR2	HIWWDDEKYYNSALKS	
44		HCDR3	IQNYGSNYWYFDV	
45		LCVD	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSRISYMFYQQKPGK APKVLIIYDTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFA TYYCQQWNAAYPLTFGQGTKLEIK	
46		LCDR1	RASSRISYMF	
47		LCDR2	DTSNLAS	

48		LCDR3	QQWNAAYPLT
49		iRhom2 человека	MASADKNGGSVSSVSSSRLQSRKPPNLSITIPPPEKETQAPG EQDSMLPEGFQNRRLKKSQPRTWAAHTTACPPSFLPKRKN PAYLKSIVSLQEPRSRWQESSEKRPGRFRRQASLSQSIRKGA QWFGVSGDWEGQRQQWQRRSLHHCSMRYGRLKASCQR DLELPSQEAPSFQGTESPKPCKMPKIVDPLARGRAFRHPEE MDRPHAPHPPLTPGVLSLTSFTSVRSYGSHLPRRKRMSVA HMSLQAAAALLKGRSVLDATGQRCRVVKRSFAFPSFLEED VVDGADTFDSSFFSKEEMSSMPDDVFESPLSASYFRGIPH SASPVPDGVQIPLKEYGRAPVPGPRRGKRIASKVKHFAFD RKKRHYGLGVGNWLNRSYRRSISSTVQRQLESFDSHRPY FTYWLTFVHVITLLVICTYGIAPVGF AQHVTTQLVLRNKG VYESVKYIQENFWVGPSSIDLHLGAKFSPCIRKDGQIEQL VLRERDLERDSGCCVQNDHSGCIQTQRKDCSETLATFVK WQDDTGPPMDKSDLGQKRTSGAVCHQDPRTEEPASSGA HIWPDDITKWPICTEQARSNHTGFLHMDCEIKGRPCCIGTK GSCEITREYCEFMHGYFHHEATLCSQVHCLDKVCGLLPF LNPEVPDQFYRLWLSLFLHAGVVHCLVS VVFQMTILRDLE KLAGWHRIAIFILSGITGNLASAIFLPYRAEVGPAGSQFGL LACLFVELFQSWPLLERPWKAFLNLSAIVLFLFICGLLPWID NIAHIFGFLSGLLAF AFLPYITFGTSDKYRKRALILVSLAF AGLFAALVLWLYIYPINWPWIEHLTCFPFSTRFCEKYELDQ VLH
50		iRhom1 человека	MSEARRDSTSSLQRKKPPWLKLDIPSAVPLTAEEPSFLQPL RRQAFLRSVSMPTAETAHISPHHELRRPVLQRQTSITQTIRR GTADWFGVSKDSDSTQKWQRKSIRHCSQRYGKLPQVLR ELDLPSQDNVSLTSTETPPPLYVGPCQLGMQKIIDPLARGR AFRVADDTAEGLSAPHTPVTPGAASLCFSSSRSGFHRLPR RRKRESVAKMSFRAAAALMKGRSVRDGTFRRARRSFTP ASFLEEDTTDFPDELDTSFAREGILHEELSTYPDEVFESPSE AALKDWEKAPEQADLTGGALDRSELERSHLMLPLERGW KQKEGAAAPQPKVRLRQEVVSTAGPRRGQRIAVPVRKLF AREKRPYGLGMVGRLTNRTRYRKRIDSFVKRQIEDMDDHR PFFTYWLTFVHSLVTLAVCIYGIAPVGF SQHETVDSVLRN RGVYENVKYVQQENFWIGPSSEALIHLGAKFSPCMRQDPQ VHSFIRSAREKHSACCVRNDRSGCVQTSEEECSSTLAV WVKWPIHPSAPELAGHQRQFGSVCHQDPRVCDEPSSDPH EWPEDITKWPICTKNSAGNHTNHPHMDCVITGRPCCIGTK GRCEITSREYCDFMRGYFHHEATLCSQVHCMDDVCGLLPF LNPEVPDQFYRLWLSLFLHAGILHCLVSICFQMTVLRDLEK LAGWHRIAIIYLLSGVTGNLASAIFLPYRAEVGPAGSQFGIL ACLFVELFQSWQILARPWRAFFKLLAVVLFVFTFGLLPWID NFAHISGFISGLFLSFAFLPYISFGKFDLYRKRCQIIIFQVVFL GLLAGLVVLFYVYPVRCEWCEFLTCIPFTDKFCEKYELDA QLH

51		мышинный iRhom2	MASADKNGSNLPSVSGSRLQSRKPPNLSITIPPPESQAPGEQ DSMLPERRKNPAYLKS VSLQEPRGRWQEGA EKRPGRFRRQ ASLSQSIRKSTAQWFGVSGDWEGKRQNWHRSLHHCSVH YGR LKASCQRELELPSQEVPSFQGTESPCKPKMPKIVDPLA RGRAFRHPDEVDRPHAAHPPLTPGVLSLTSFTSVRSGYSHL PRRKRI SVAHMSFQAAAALLKGRSVLDATGQRCRHVKRS FA YPSFLEEDA VDGADTFDSSFFSKEEMSSMPDDVFESPL SASYFRGVPHSASPVSPDGVHIPLKEYSGGRALGPGTQRG KRIASKVKHFAFDRKKRHYGLGVVGNWLNRSYRRSISSTV QRQLESFDSHRPYFTYWLTFVHIITLLVICTYGIAPVGF AQ HVT TQLVLKNRGVYESVKYIQQENFWIGPSSIDLIHLGAKF SPCIRKDQIEQLVRRERDIERTSGCCVQNDRSGCIQTLKK DCSETLATFVKWQNDTGPSDKSDLSQKQPSAVVCHQDPR TCEEPASSGAHIWPDDITKWPICTEQAQSNHTGLLHIDCKI KGRPCCIGTKGSCEITREYCEFMHGYFHEDATLCSQVHC LDKVCGLLPFLNPEVPDQFYRIWLSLFLHAGIVHCLVSVVF QMTILRDLEKLAGWHRISIIFILSGITGNLASAIFLPYRAEVG PAGSQFGLLACLFVELFQSWQLLERPWKAFFNLSAIVLFLF ICGLLPWIDNIAHIFGFLSGMLLAF AFLPYITFGTSDKYRKR ALILVSLLVFAGLFA SLVLWLYIYPINWPWIEYLTCFPFTR FCEKYELDQVLH
----	--	--------------------	--

SEQ ID No кДНК/ РНК	Клон №	Тип	Аминокислотная последовательность (для РНК замена Т на U)
52/100	16-B-03	HCVD	CAGGTGACCCTGAGGGAGAGCGGCCCCCGCCCTGGTGA AGCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCAGC GGCTTCAGCCTGAGCACCTTCGCCCTGGGCGTGGGCTG GATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTG GCCACATCTGGTGGGACGACGACAAGTACTACAACCC CGCCCTGAAGAGCAGGCTGACCATCAGCAAGGACACC AGCAAGAACCAGGTGGTGCTGACCATCACCAACATGG ACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGCGCCAGGATC ACCACCTACTACTACGGCATGGACTACTGGGGCCAGGG CACCTGGTGACCGTGAGCAGC
53/101		HCDR 1	ACCTTCGCCCTGGGCGTGGGC
54/102		HCDR 2	CACATCTGGTGGGACGACGACAAGTACTACAACCCCGC CCTGAAGAGC
55/103		HCDR 3	ATCACCACCTACTACTACGGCATGGACTAC
56/104		LCVD	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACTTCCAGAGCGT GACCCCAAGGAGAAGGTGACCATCACCCTGCAGGGCC AGCCAGAGCATCGGCAACCACCTGCACTGGTACCAGCA GAAGCCCAGCGCCAGCCCCAAGCTGCTGATCAAGTACG CCAGCCAGAGCATCAGCGGCGTGCCAGCAGGTTACAGC GGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAA CAGCCTGGAGGCCGAGGACGCCGCCACCTACTTCTGCC AGCAGAGCTACCAGTGGCCCCTGACCTTCGGCCAGGGC ACCAAGCTGGAGATCAAG

57/105		LCDR1	AGGGCCAGCCAGAGCATCGGCAACCACCTGCAC
58/106		LCDR2	TACGCCAGCCAGAGCATCAGC
59/107		LCDR3	CAGCAGAGCTACCAGTGGCCCCTGACC
60/108	16-B-05	HCVD	CAGGTGACCCTGAGGGAGAGCGGCCCCCGCCCTGGTGA AGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCAGC GGCTTCAGCCTGAGCACCTTCGCCCTGGGCGTGGGCTG GATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTG GCCACATCTGGTGGGACGAGGACAAGTACTACAACCC CGCCCTGAAGAGCAGGCTGACCATCAGCAAGGACACC AGCAAGAACCAGGTGGTGTGCTGACCATCACCAACATGG ACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGCGCCAGGATC ACCACCTACTACTACGGCATGGACTACTGGGGCCAGGG CACCTGGTGACCGTGAGCAGC
61/109		HCDR 1	ACCTTCGCCCTGGGCGTGGGC
62/110		HCDR 2	CACATCTGGTGGGACGAGGACAAGTACTACAACCCCGC CCTGAAGAGC
63/111		HCDR 3	ATCACCACCTACTACTACGGCATGGACTAC
64/112		LCVD	GAGATCGTGATGACCAGAGCCCCGACTTCCAGAGCGT GACCCCAAGGAGAAGGTGACCATCACCTGCAGGGCC AGCCAGAGCATCGGCAACCACCTGCACTGGTACCAGCA GAAGCCCGACGCCAGCCCCAAGCTGCTGATCAAGTACG CCAGCCAGAGCATCAGCGGCGTGCCAGCAGGTTACAGC GGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAA CAGCCTGGAGGCCGAGGACGCCGCCACCTACTTCTGCC AGCAGAGCTACAACCTGGCCCCTGACCTTCGGCCAGGGC ACCAAGCTGGAGATCAAG
65/113		LCDR1	AGGGCCAGCCAGAGCATCGGCAACCACCTGCAC
66/114		LCDR2	TACGCCAGCCAGAGCATCAGC
67/115		LCDR3	CAGCAGAGCTACAACCTGGCCCCTGACC
68/116	16-B-07	HCVD	CAGGTGACCCTGAGGGAGAGCGGCCCCCGCCCTGGTGA AGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCAGC GGCTTCAGCCTGAGCACCTTCGCCCTGGGCGTGGGCTG GATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTG GCCACATCTGGTGGGACGAGGACAAGTACTACAACCC CGCCCTGAAGAGCAGGCTGACCATCAGCAAGGACACC AGCAAGAACCAGGTGGTGTGCTGACCATCACCAACATGG ACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGCGCCAGGATC ACCACCTACTACTACGGCATGGACTACTGGGGCCAGGG CACCTGGTGACCGTGAGCAGC
69/117		HCDR 1	ACCTTCGCCCTGGGCGTGGGC
70/118		HCDR 2	CACATCTGGTGGGACGAGGACAAGTACTACAACCCCGC CCTGAAGAGC
71/119		HCDR 3	ATCACCACCTACTACTACGGCATGGACTAC

72/120		LCVD	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACTTCCAGAGCGT GACCCCCAAGGAGAAGGTGACCATCACCTGCAGGGCC AGCCAGAGCATCGGCAACCACCTGCACTGGTACCAGCA GAAGCCCGACGCCAGCCCCAAGCTGCTGATCAAGTACG CCAGCCAGAGCATCAGCGGCGTGCCCAGCAGGTTTCAGC GGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAA CAGCCTGGAGGCCGAGGACGCCGCCACCTACTTCTGCC AGCAGAGCTACCAGTGGCCCCTGACCTTCGGCCAGGGC ACCAAGCTGGAGATCAAG
73/121		LCDR1	AGGGCCAGCCAGAGCATCGGCAACCACCTGCAC
74/122		LCDR2	TACGCCAGCCAGAGCATCAGC
75/123		LCDR3	CAGCAGAGCTACCAGTGGCCCCTGACC
76/124		HCVD	CAGGTGACCCTGAGGGAGAGCGGCCCCCGCCCTGGTGA AGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCAGC GGCTTCAGCCTGAGCACCTTCGGCATGGGCGTGGGCTG GATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTG GCCACATCTGGTGGGACGACGAGAAGTACTACAACA GCGCCCTGAAGAGCAGGCTGACCATCAGCAAGGACAC CAGCAAGAACCAGGTGGTGTGACCATCACCAACATG GACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGCGCCAGGAT CAGCAACTACGGCAGCAACTACTGGTACTTCAACGTGT GGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC
77/125	23-B-04	HCDR 1	ACCTTCGGCATGGGCGTGGGC
78/126		HCDR 2	CACATCTGGTGGGACGACGAGAAGTACTACAACAGCG CCCTGAAGAGC
79/127		HCDR 3	ATCAGCAACTACGGCAGCAACTACTGGTACTTCAACGT G
80/128		LCVD	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGC CAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGGGCC AGCAGCAGCGTGAGCTACATGTACTGGTACCAGCAGA AGCCCGGCAAGGCCCCCAAGGTGCTGATCTACGACACC AGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCAGCAGGTTTCAGCG GCAGCGGCAGCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGC AGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCA GCAGTGGAACGCCTACCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCA CCAAGCTGGAGATCAAG
81/129		LCDR1	AGGGCCAGCAGCAGCGTGAGCTACATGTAC
82/130	LCDR2	GACACCAGCAACCTGGCCAGC	
83/131	LCDR3	CAGCAGTGGAAACGCCTACCCCCTGACC	
84/132	42-B-02	HCVD	CAGGTGACCCTGAGGGAGAGCGGCCCCCGCCCTGGTGA AGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCAGC GGCTTCAGCCTGAGCACCTTCGGCAGGGGCGTGGGCTG GATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTG GCCACATCTGGTGGGACGACGAGAAGTACTACAACA GCGCCCTGAAGAGCAGGCTGACCATCAGCAAGGACAC CAGCAAGAACCAGGTGGTGTGACCATCACCAACATG GACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGCGCCAGGAT CCAGAACTACGGCAGCAACTACTGGTACTTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC

85/133	42-B-04	HCDR 1	ACCTTCGGCAGGGGCGTGGGC
86/134		HCDR 2	CACATCTGGTGGGACGACGAGAAGTACTACAACAGCG CCCTGAAGAGC
87/135		HCDR 3	ATCCAGAACTACGGCAGCAACTACTGGTACTTCGACGT G
88/136		LCVD	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGC CAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGGGCC AGCAGCAGGATCAGCTACATGTTCTGGTACCAGCAGAA GCCCCGCAAGGCCCCCAAGGTGCTGATCTACGACACCA GCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCAGCAGGTTTCAGCGGC AGCGGCAGCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCA GCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTGGAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCCAGGGCAC CAAGCTGGAGATCAAG
89/137		LCDR1	AGGGCCAGCAGCAGGATCAGCTACATGTTC
90/138		LCDR2	GACACCAGCAACCTGGCCAGC
91/139		LCDR3	CAGCAGTGGAACAGCTACCCCTGACC
92/140		HCVD	CAGGTGACCCTGAGGGAGAGCGGCCCCCGCCCTGGTGA AGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCAGC GGCTTCAGCCTGAGCACCTTCGGCAGGGGCGTGGGCTG GATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTG GCCACATCTGGTGGGACGACGAGAAGTACTACAACA GCGCCCTGAAGAGCAGGCTGACCATCAGCAAGGACAC CAGCAAGAACCAGGTGGTGTGCTGACCATCACCAACATG GACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGCGCCAGGAT CCAGAACTACGGCAGCAACTACTGGTACTTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC
93/141		HCDR 1	ACCTTCGGCAGGGGCGTGGGC
94/142		HCDR 2	CACATCTGGTGGGACGACGAGAAGTACTACAACAGCG CCCTGAAGAGC
95/143		HCDR 3	ATCCAGAACTACGGCAGCAACTACTGGTACTTCGACGT G
96/144		LCVD	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGC CAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGGGCC AGCAGCAGGATCAGCTACATGTTCTGGTACCAGCAGAA GCCCCGCAAGGCCCCCAAGGTGCTGATCTACGACACCA GCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCAGCAGGTTTCAGCGGC AGCGGCAGCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCA GCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTGGAACGCCTACCCCTGACCTTCGGCCAGGGCAC CAAGCTGGAGATCAAG
97/145		LCDR1	AGGGCCAGCAGCAGGATCAGCTACATGTTC
98/146		LCDR2	GACACCAGCAACCTGGCCAGC
99/147		LCDR3	CAGCAGTGGAACGCCTACCCCTGACC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело, связывающее iRhom2, или его мишень-связывающий фрагмент или мишень-связывающее производное, сохраняющие способности связывать мишень, которые

а) содержат набор из трех определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи и трех определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи, содержащийся в одной из следующих пар последовательностей переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи

- SEQ ID NO 1 и 5,
- SEQ ID NO 9 и 13,
- SEQ ID NO 17 и 21,
- SEQ ID NO 25 и 29,
- SEQ ID NO 33 и 37 или
- SEQ ID NO 41 и 45,

б) содержат набор из трех определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи и трех определяющих комплементарность областей (CDR) легкой цепи, выбранный из

- SEQ ID NO 2, 3, 4, 6, 7 и 8,
- SEQ ID NO 10, 11, 12, 14, 15 и 16,
- SEQ ID NO 18, 19, 20, 22, 23 и 24,
- SEQ ID NO 26, 27, 28, 30, 31 и 32,
- SEQ ID NO 34, 35, 36, 38, 39 и 40 или
- SEQ ID NO 42, 43, 44, 46, 47 и 48,

с) содержат набор определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи/легкой цепи согласно б), при условии, что по меньшей мере одна из CDR имеет до 3 аминокислотных замен относительно соответствующих SEQ ID NO, и/или

д) содержат набор определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи/легкой цепи согласно б) или с), при условии, что по меньшей мере одна из CDR имеет идентичность последовательности $\geq 66\%$ с соответствующими CDR, содержащимися в последовательностях SEQ ID NO,

где CDR включены в подходящий белковый каркас, предпочтительно каркас переменного домена, так, чтобы обладать способностью связываться с iRhom2 человека.

2. Антитело или фрагмент по п. 1, в котором CDR определены в соответствии с определением согласно Кабату, Chothia или MacCallum, предпочтительно CDR определены в соответствии с нумерацией, как представлено в Таблице 1.

3. Антитело или фрагмент по любому из пп. 1 - 2, которые содержат

а) пары переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи (HCVD/LCVD), представленные в следующих парах SEQ ID NO:

- 1 и 5,
- 9 и 13,
- 17 и 21,
- 25 и 29,
- 33 и 37 и/или
- 41 и 45,

б) пары переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи (HCVD/LCVD) согласно а), при условии, что

- HCVD имеет идентичность последовательности $\geq 80\%$ с соответствующей SEQ ID NO, и/или

- LCVD имеет идентичность последовательности $\geq 80\%$ с соответствующей SEQ ID NO,

с) пары переменных доменов (VD) тяжелой цепи/легкой цепи согласно а) или б), при условии, что по меньшей мере один из HCVD или LCVD имеет до 10 аминокислотных замен относительно соответствующей SEQ ID NO,

причем указанное антитело или фрагмент все еще способны связываться с iRhom2 человека и/или ингибировать или снижать активность TACE/ADAM17.

4. Антитело или фрагмент по любому из пп. 1 - 3, в котором по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой консервативную аминокислотную замену.

5. Антитело или фрагмент по любому из вышеуказанных пунктов, где антитело или фрагмент имеет по меньшей мере одно из

- аффинности связывания с мишенью $\geq 50\%$ с iRhom2 человека по сравнению с такой аффинностью связывания с мишенью антитела или фрагмента по любому из вышеуказанных пунктов, и/или

- $\geq 50\%$ от ингибирующего или снижающего эффекта в отношении активности TACE/ADAM17 антитела или фрагмента по любому из вышеуказанных пунктов.

6. Гуманизованное антитело, которое связывается с iRhom2 человека и конкурирует за связывание с iRhom2 человека с

a) антителом по любому из пп. 1 – 5 или

b) антителом, выбранным из группы, состоящей из клонов 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02 и/или 42-B-04.

7. Гуманизированное антитело, которое связывается по существу с той же или с той же областью на iRhom2 человека, что и

a) антитело по любому из пп. 1 – 5 или

b) антитело, выбранное из группы, состоящей из клонов 16-B-03, 16-B-05, 16-B-07, 23-B-04, 42-B-02, и/или 42-B-04.

8. Антитело или фрагмент по любому из вышеуказанных пунктов, которые при связывании с iRhom2 человека связываются по меньшей мере в его области петли 1.

9. Антитело или фрагмент по любому из вышеуказанных пунктов, где ингибирование или снижение активности TACE/ADAM17 вызвано вмешательством в iRhom2-опосредованную активацию TACE/ADAM17.

10. Антитело или фрагмент по любому из вышеуказанных пунктов, которые при связывании с iRhom2 человека

- ингибируют или снижают индуцированный шеддинг TNF α , и/или
- ингибируют или снижают индуцированный шеддинг IL-6R, и/или
- ингибируют или снижают индуцированный шеддинг HB-EGF.

11. Антитело или фрагмент по любому из вышеуказанных пунктов, где iRhom2 человека, с которым антитело или фрагмент связывается, содержит

a) аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO 49, или

b) аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO 49, при условии, что указанная последовательность сохраняет активность iRhom2.

12. Антитело или фрагмент по любому из вышеуказанных пунктов, которые представляют собой моноклональное антитело или его мишень-связывающий фрагмент или мишень-связывающее производное, сохраняющие способности связывать мишень.

13. Антитело или фрагмент по любому из вышеуказанных пунктов, которые находятся в по меньшей мере одном из форматов, выбранных из группы, состоящей из IgG, scFv, Fab или (Fab)₂.

14. Антитело или фрагмент по любому из вышеуказанных пунктов, которые не являются перекрестно-реагирующими с iRhom1 человека.

15. Нуклеиновая кислота, которая кодирует по меньшей мере одну цепь антитела или фрагмента по любому из вышеуказанных пунктов.

16. Применение антитела или фрагмента по любому из пп. 1 – 14 или нуклеиновой кислоты по п. 15 (для получения лекарственного средства) для лечения субъекта человека или животного,

- которому поставлен диагноз,
- который страдает от
- который имеет риск развития

воспалительного состояния, или для профилактики такого состояния.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или фрагмент по любому из пп. 1 – 14 или нуклеиновую кислоту по п. 15 и необязательно одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

18. Комбинация, содержащая (i) антитело или фрагмент по любому из пп. 1 – 14, нуклеиновую кислоту по п. 15 или фармацевтическую композицию по п. 17 и (ii) одно или несколько терапевтически активных соединений.

19. Способ лечения или профилактики воспалительного состояния, причем способ предусматривает введение субъекту человеку или животному антитела или фрагмента по любому из пп. 1 – 14, нуклеиновой кислоты по п. 15, фармацевтической композиции по п. 17 или комбинации по п. 18 в терапевтически достаточной дозе.

20. Терапевтический набор из частей, содержащий:

а) антитело или фрагмент по любому из пп. 1 - 14, нуклеиновую кислоту по п. 15, фармацевтическую композицию по п. 17 или комбинацию по п. 18,

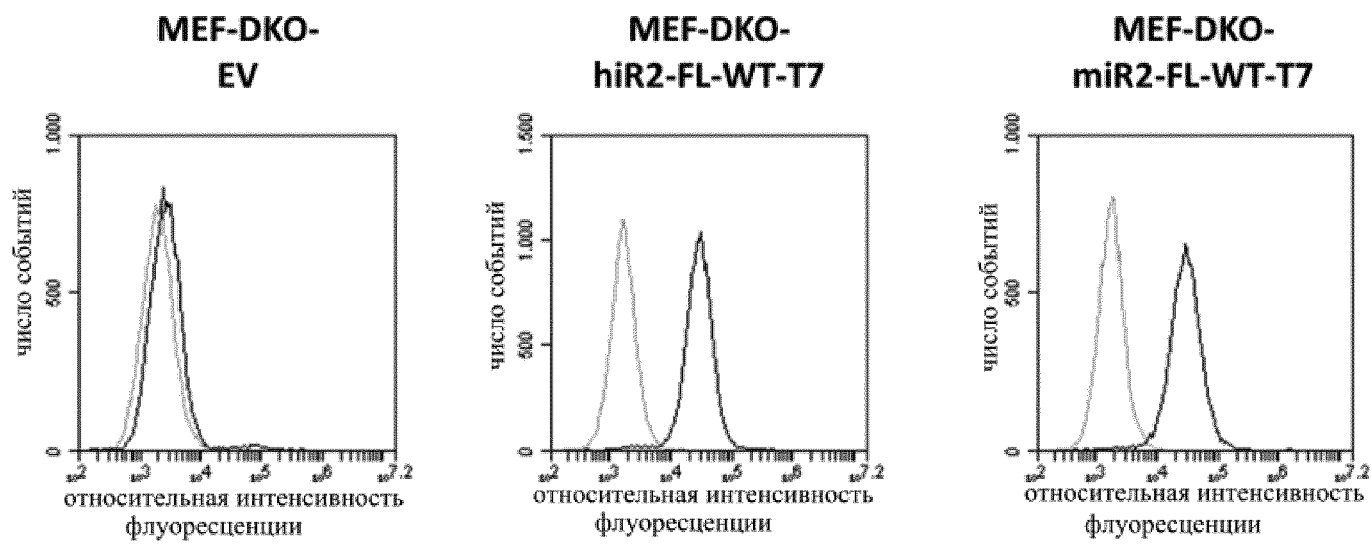
б) устройство для введения композиции, композиции или комбинации и

с) инструкции по применению.

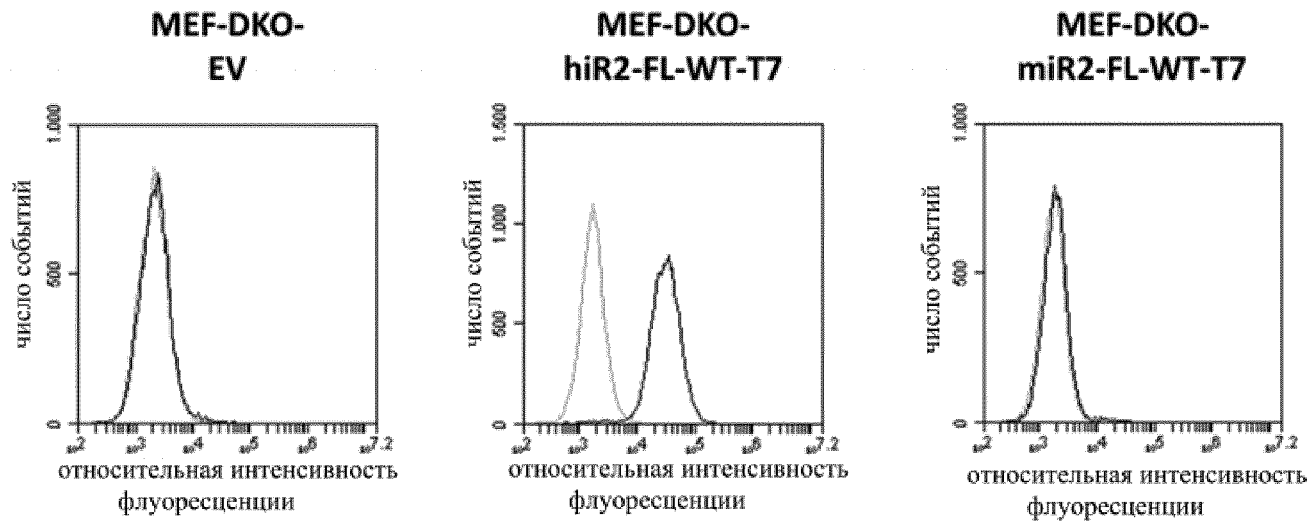
Клон №	Kd (нМ)
16-B-03	0,67
16-B-05	1,07
16-B-07	0,99
23-B-04	0,58
42-B-02	0,50
42-B-04	0,48

Фиг. 1

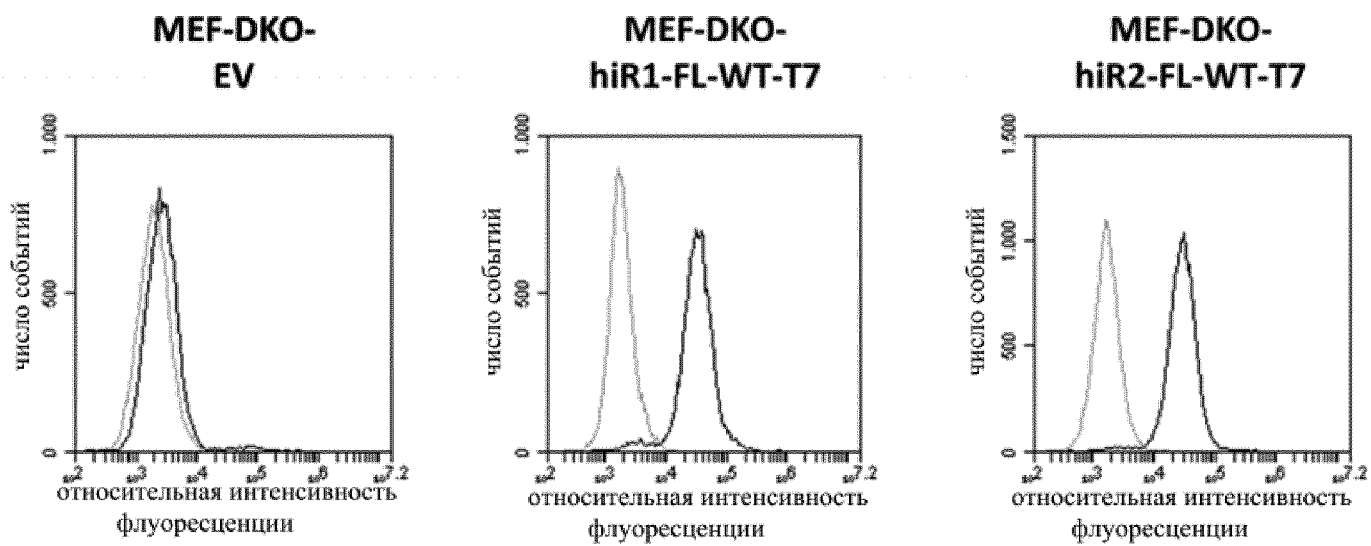
Фиг. 2а



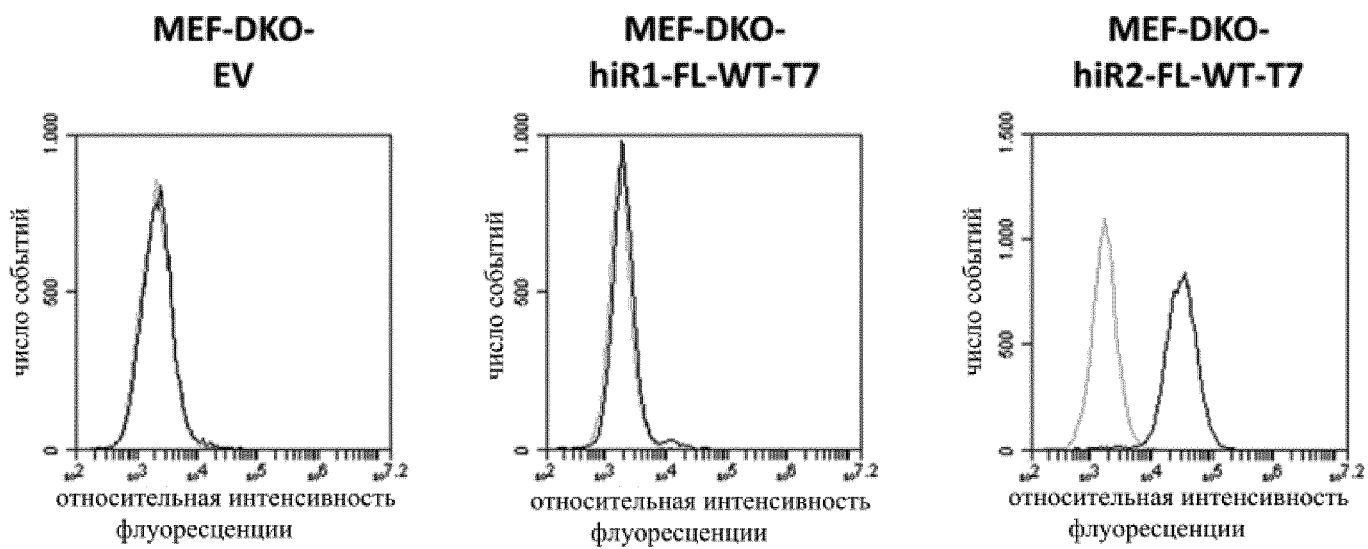
Фиг. 2b



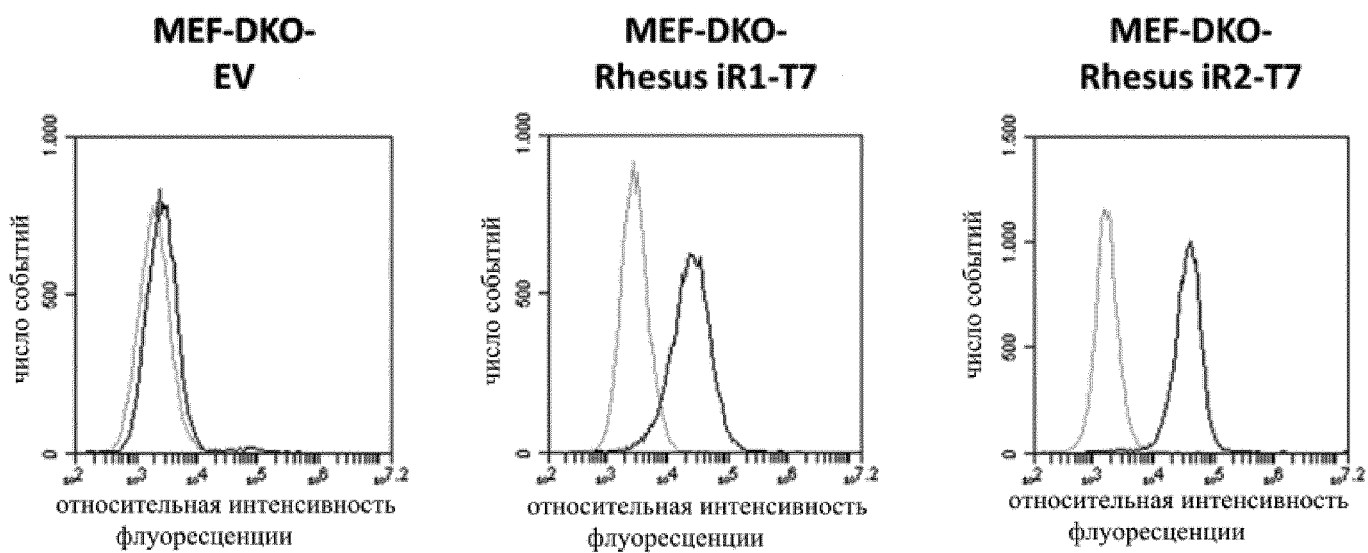
Фиг. 3а



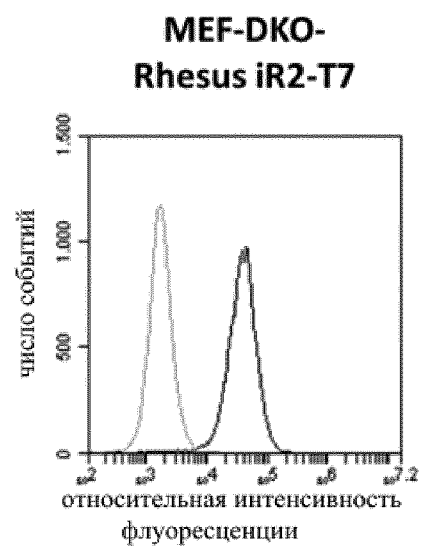
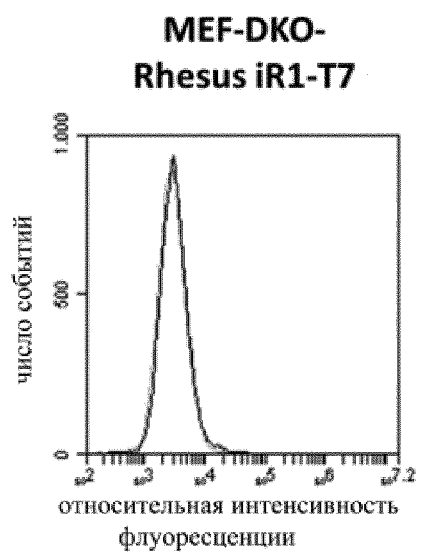
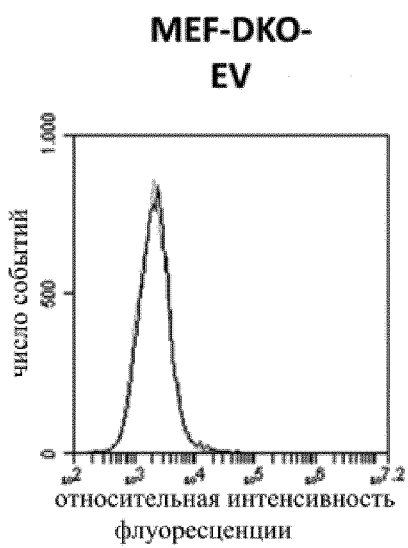
Фиг. 3b



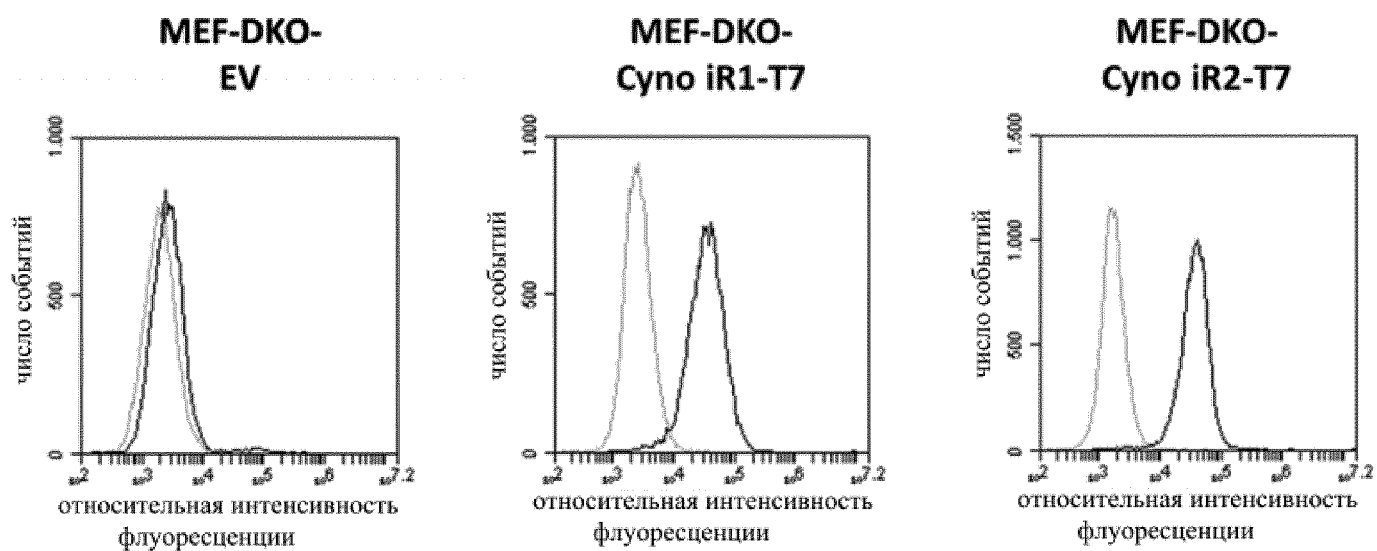
Фиг. 4а



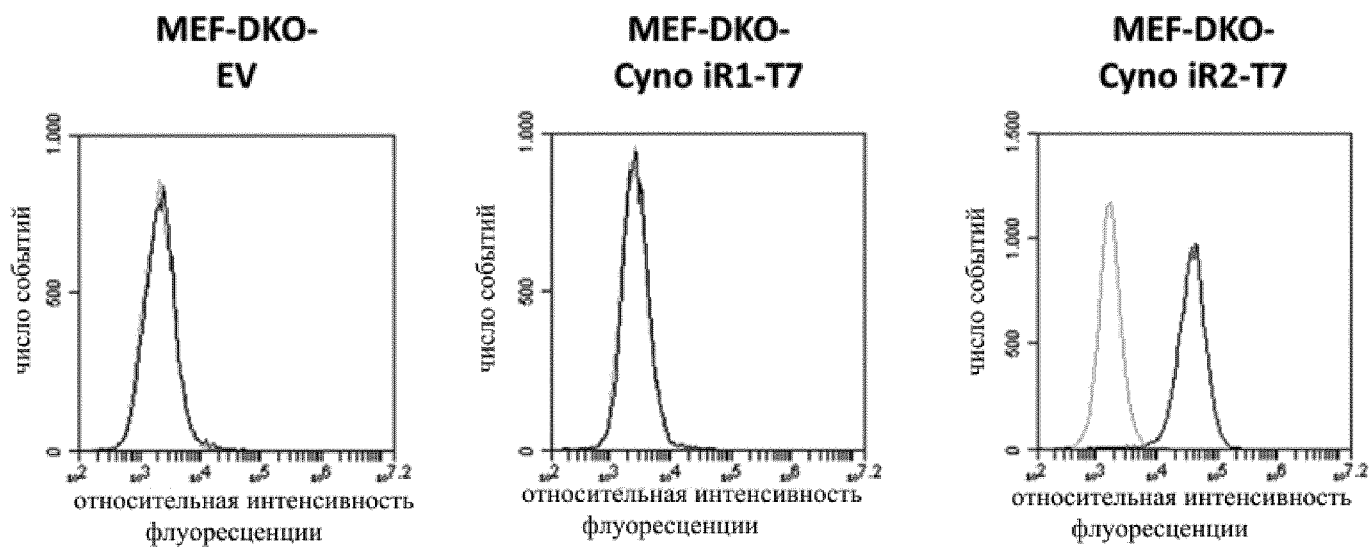
Фиг. 4b



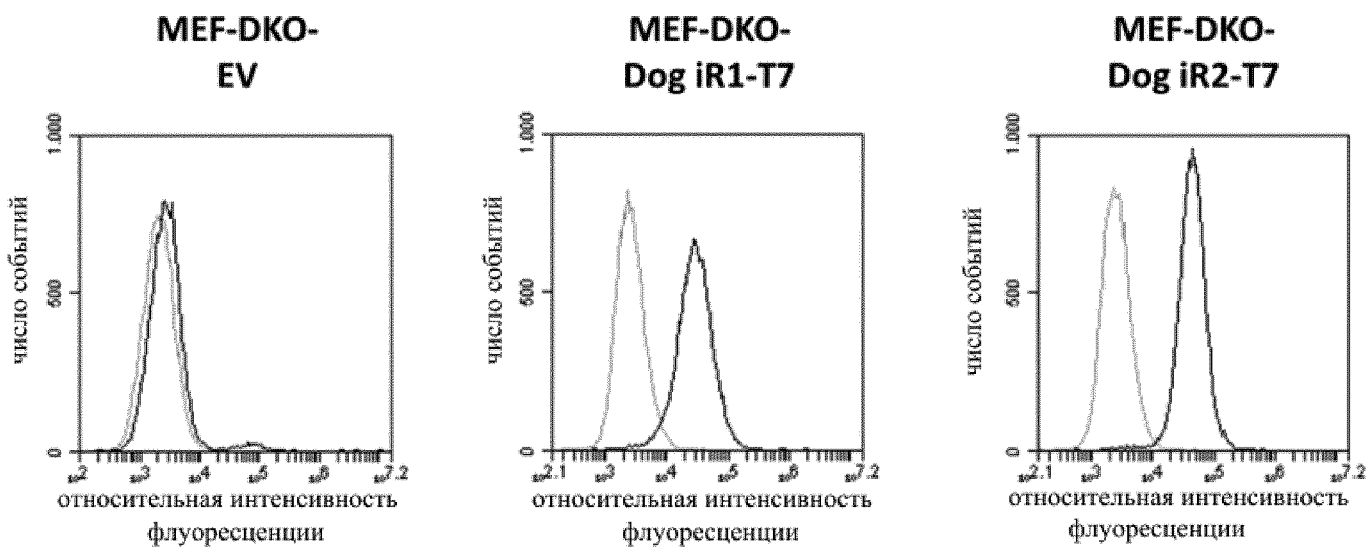
Фиг. 5a



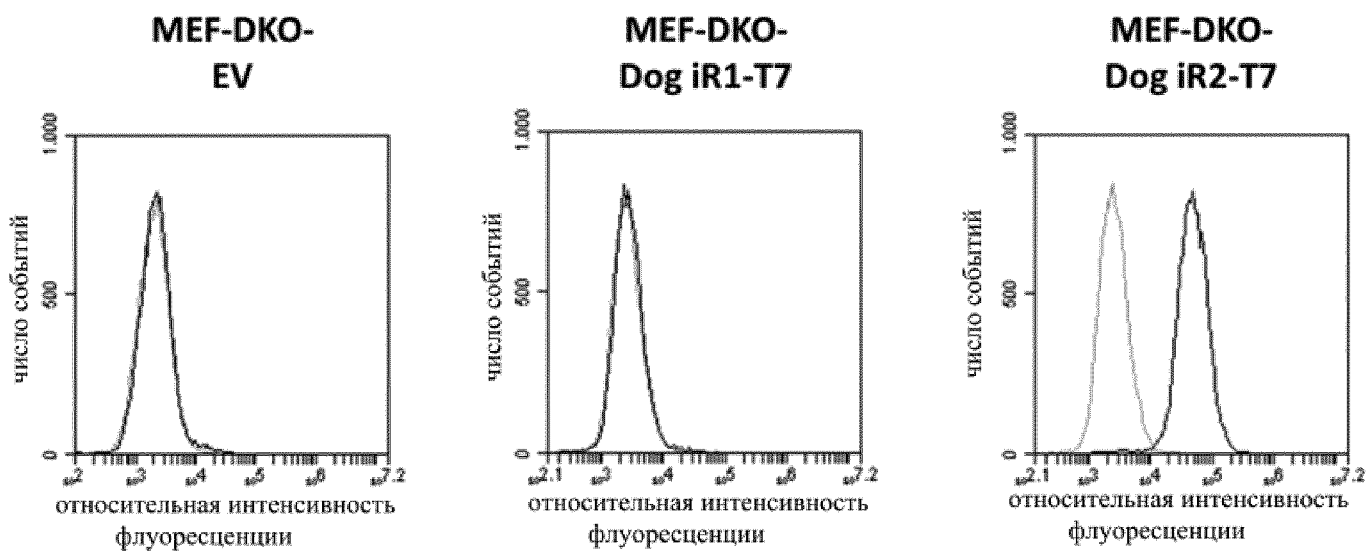
Фиг. 5b



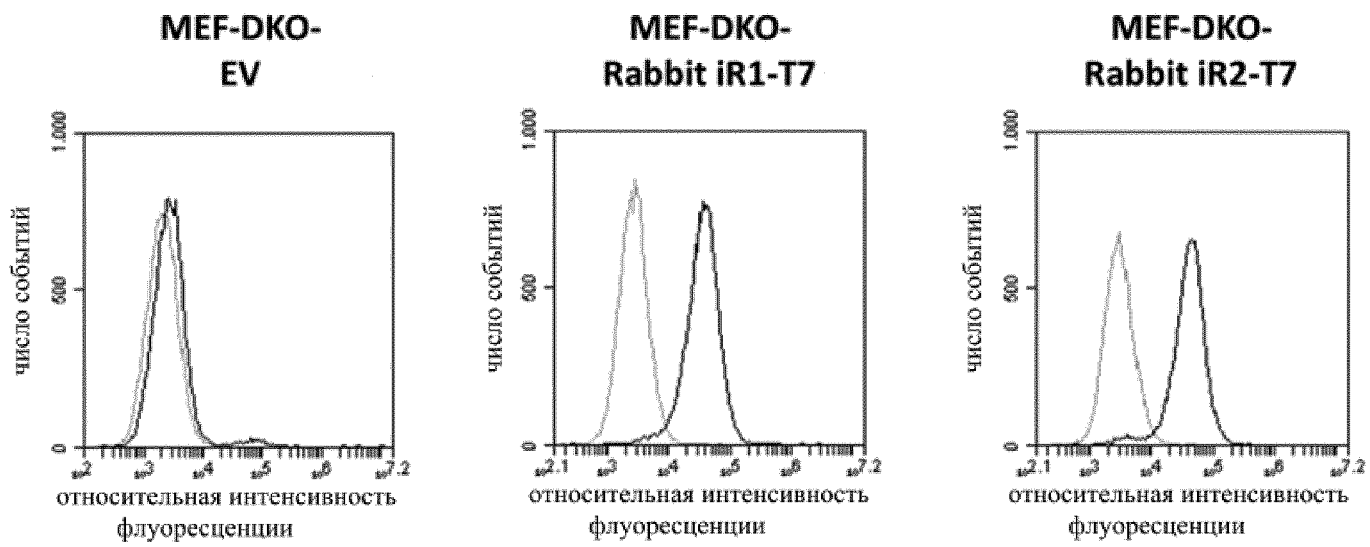
Фиг. 6а



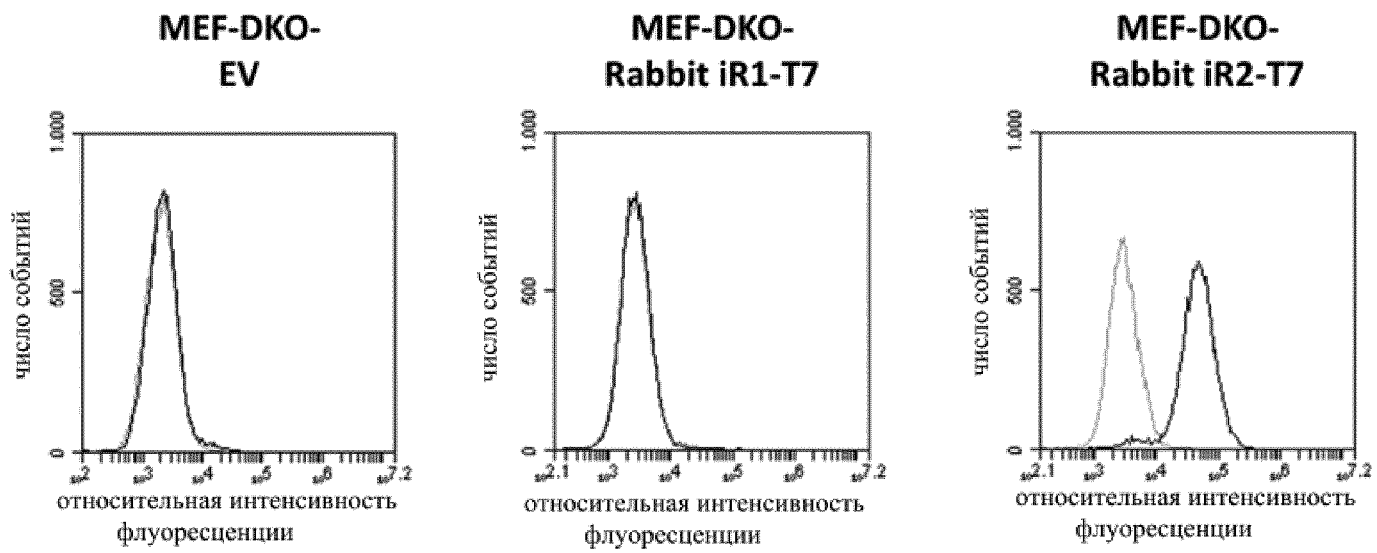
Фиг. 6b



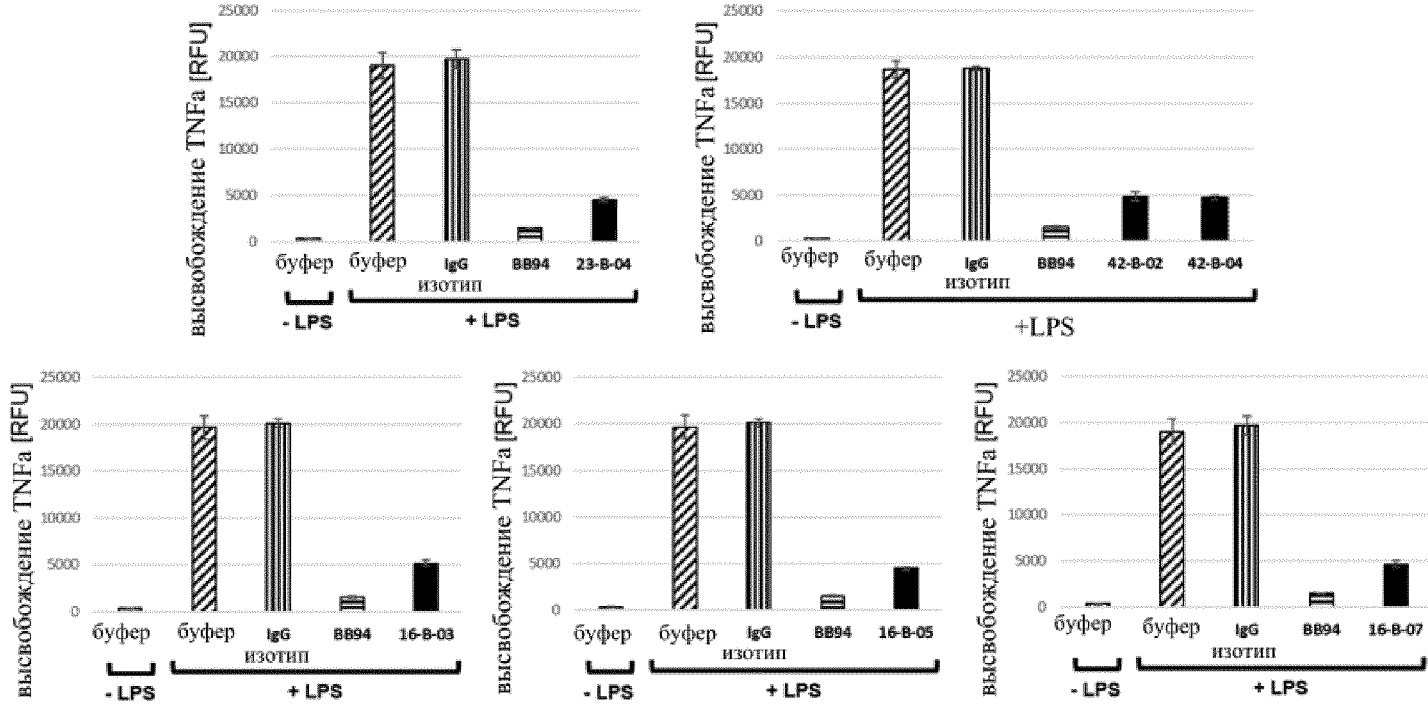
Фиг. 7а



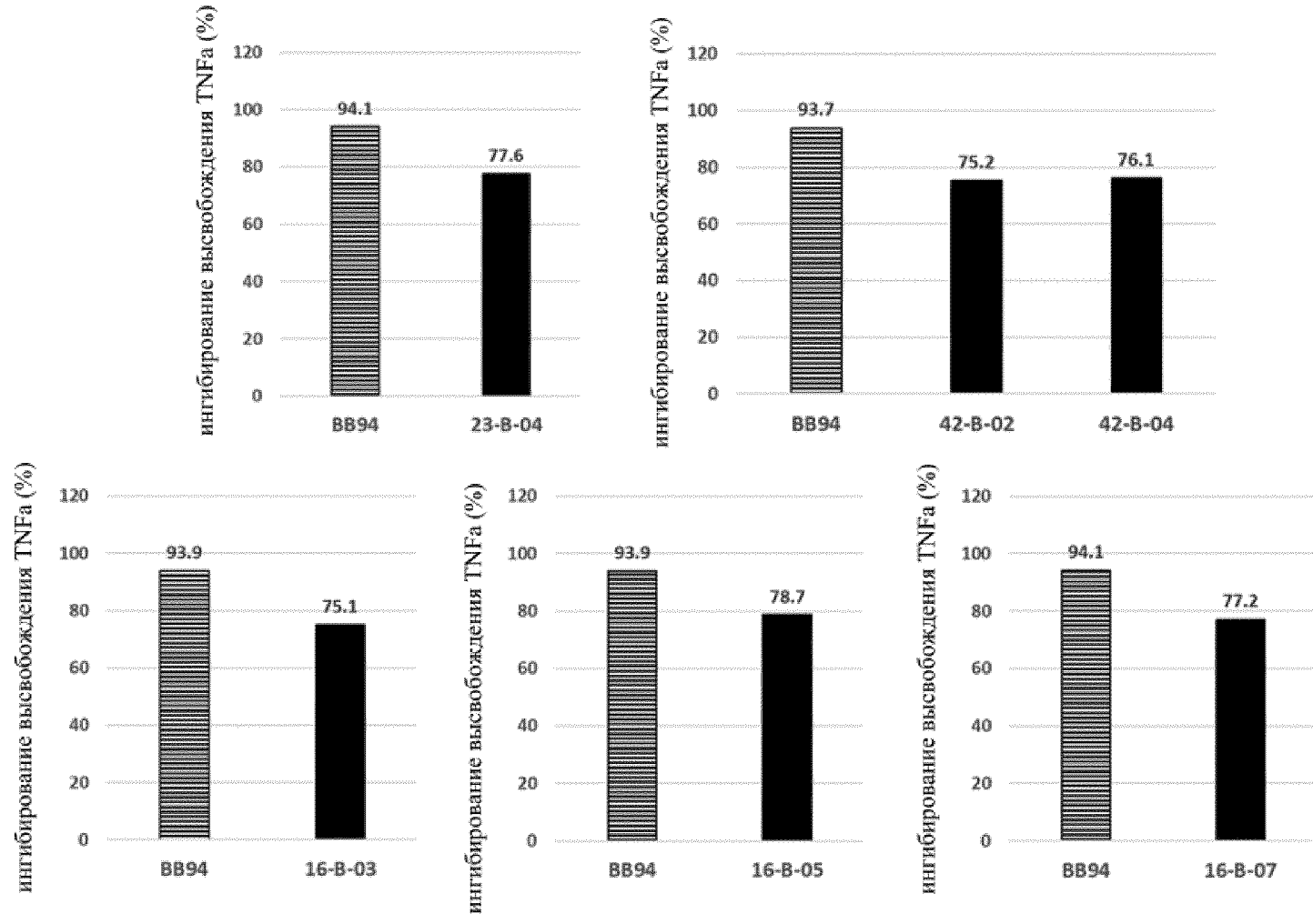
Фиг. 7b



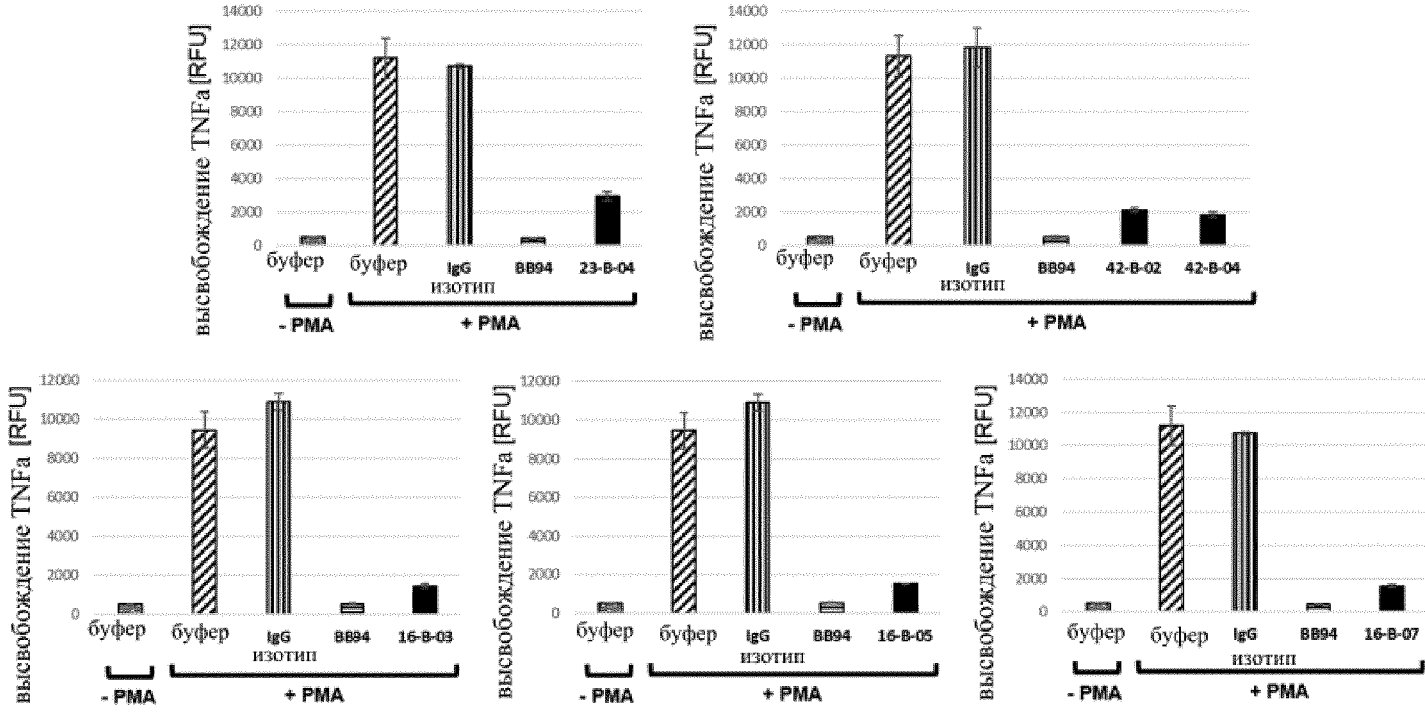
Фиг. 8а



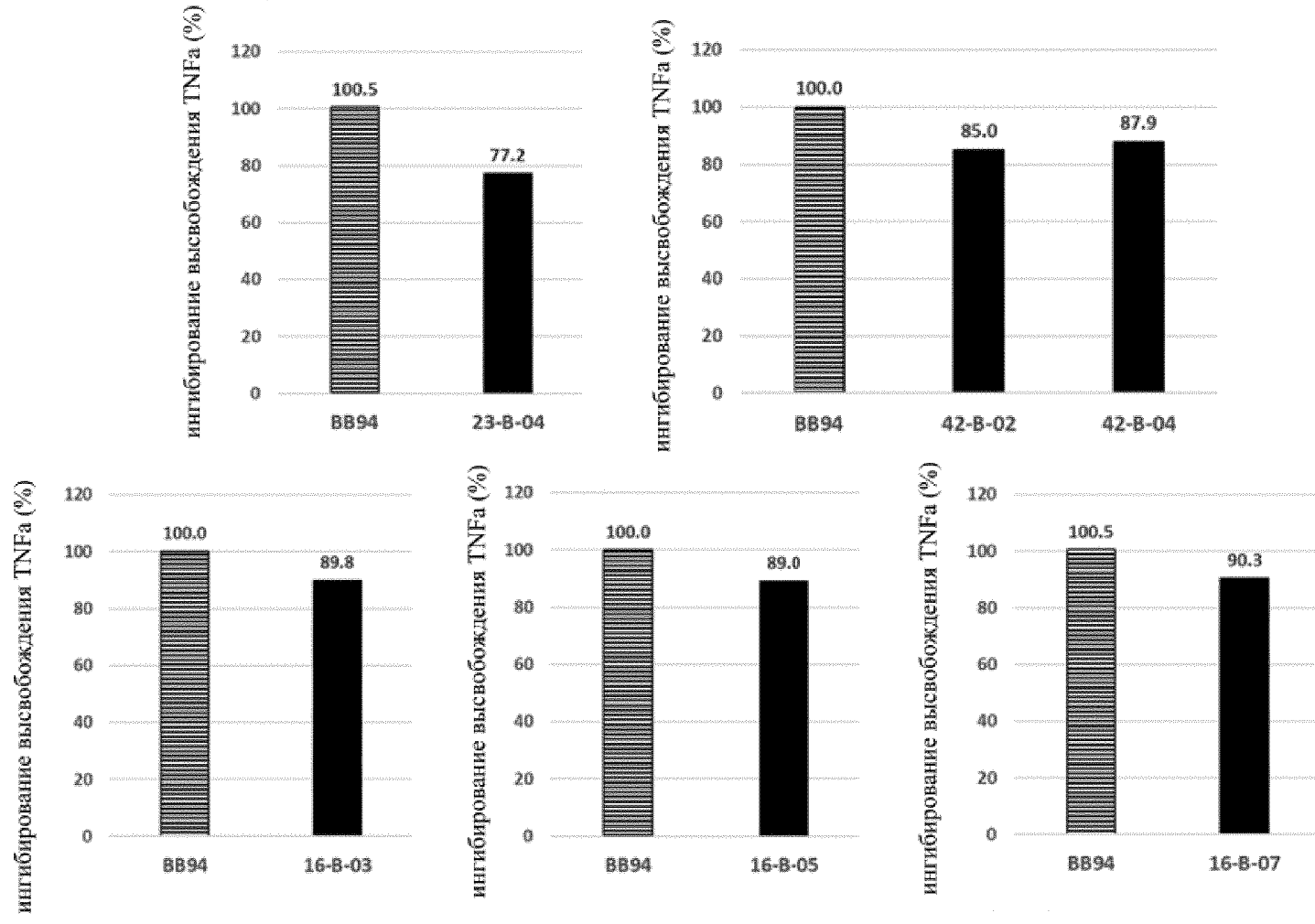
Фиг. 8b



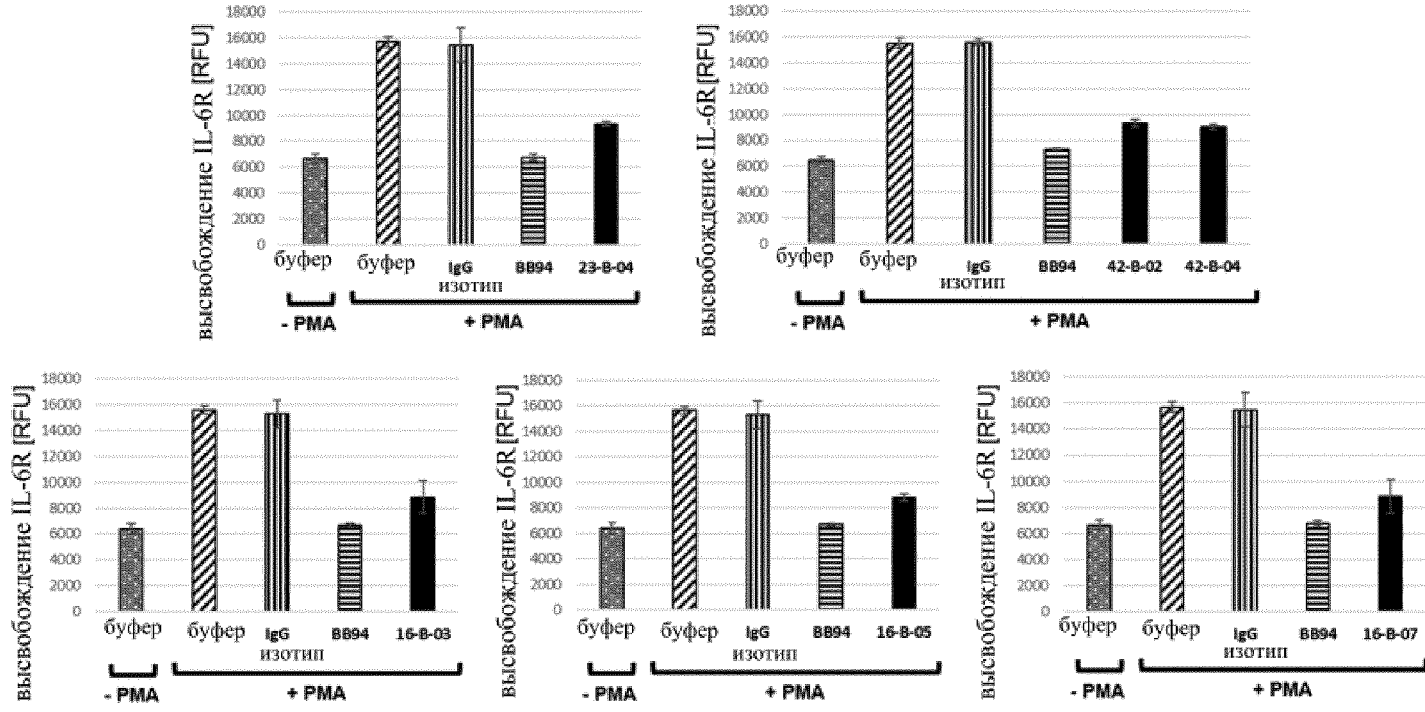
Фиг. 9а



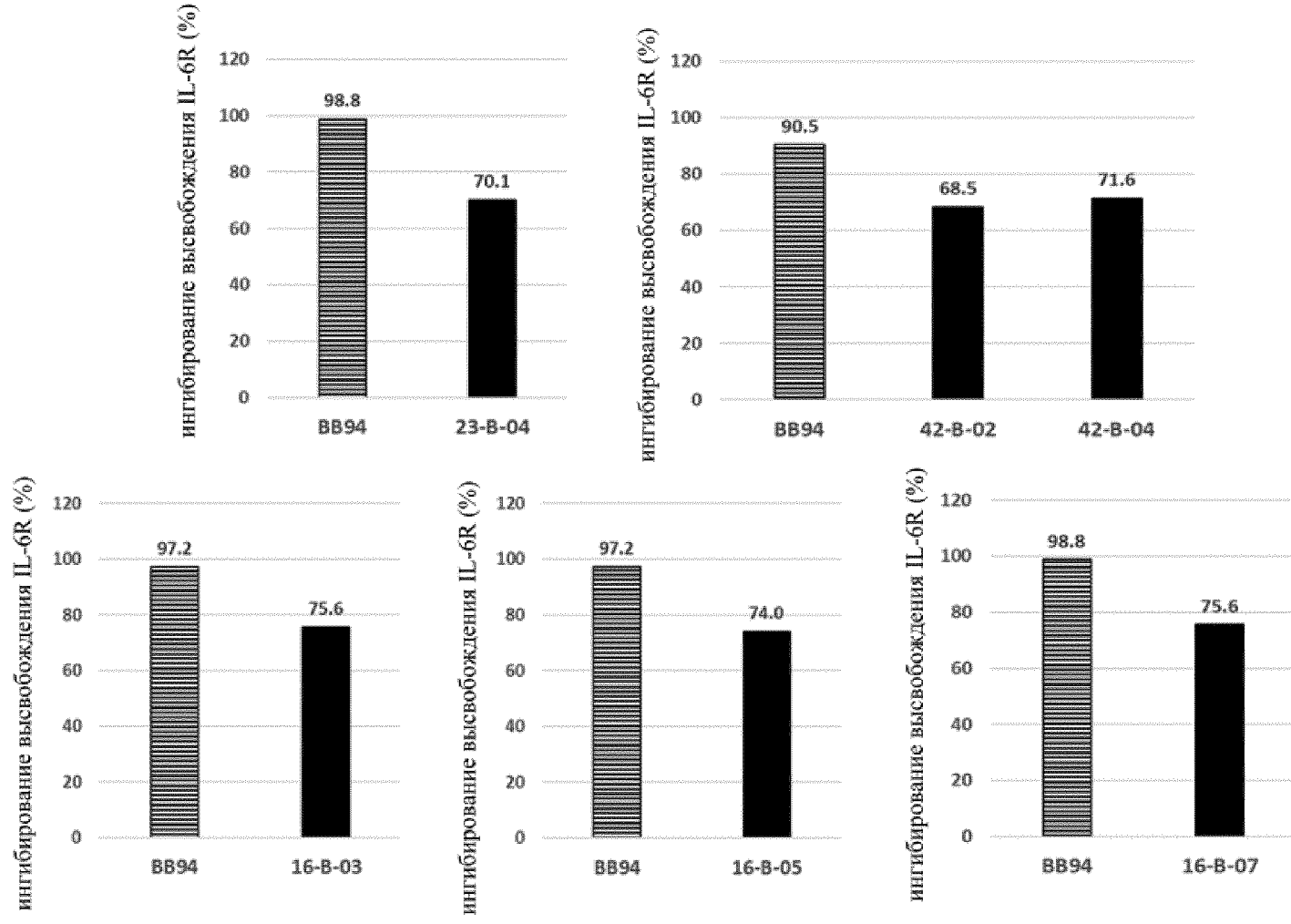
Фиг. 9б



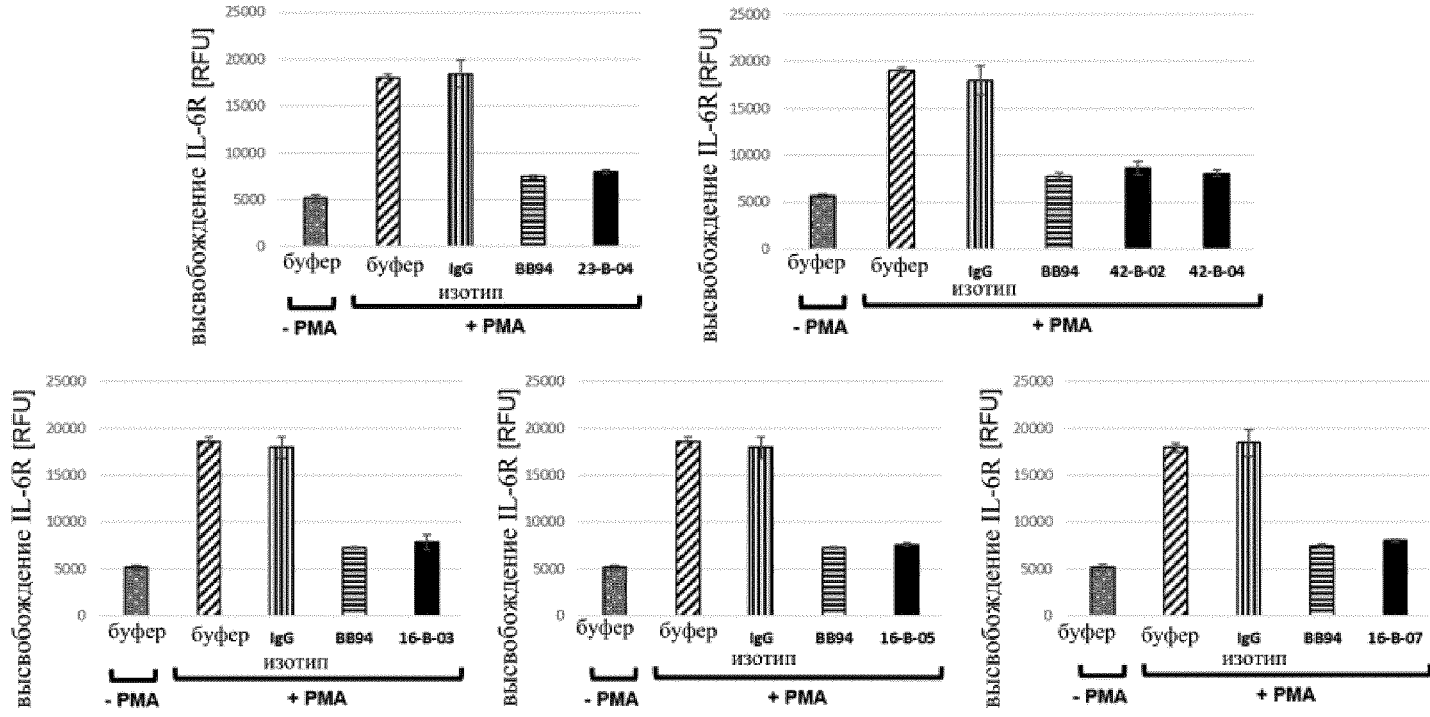
Фиг. 10а



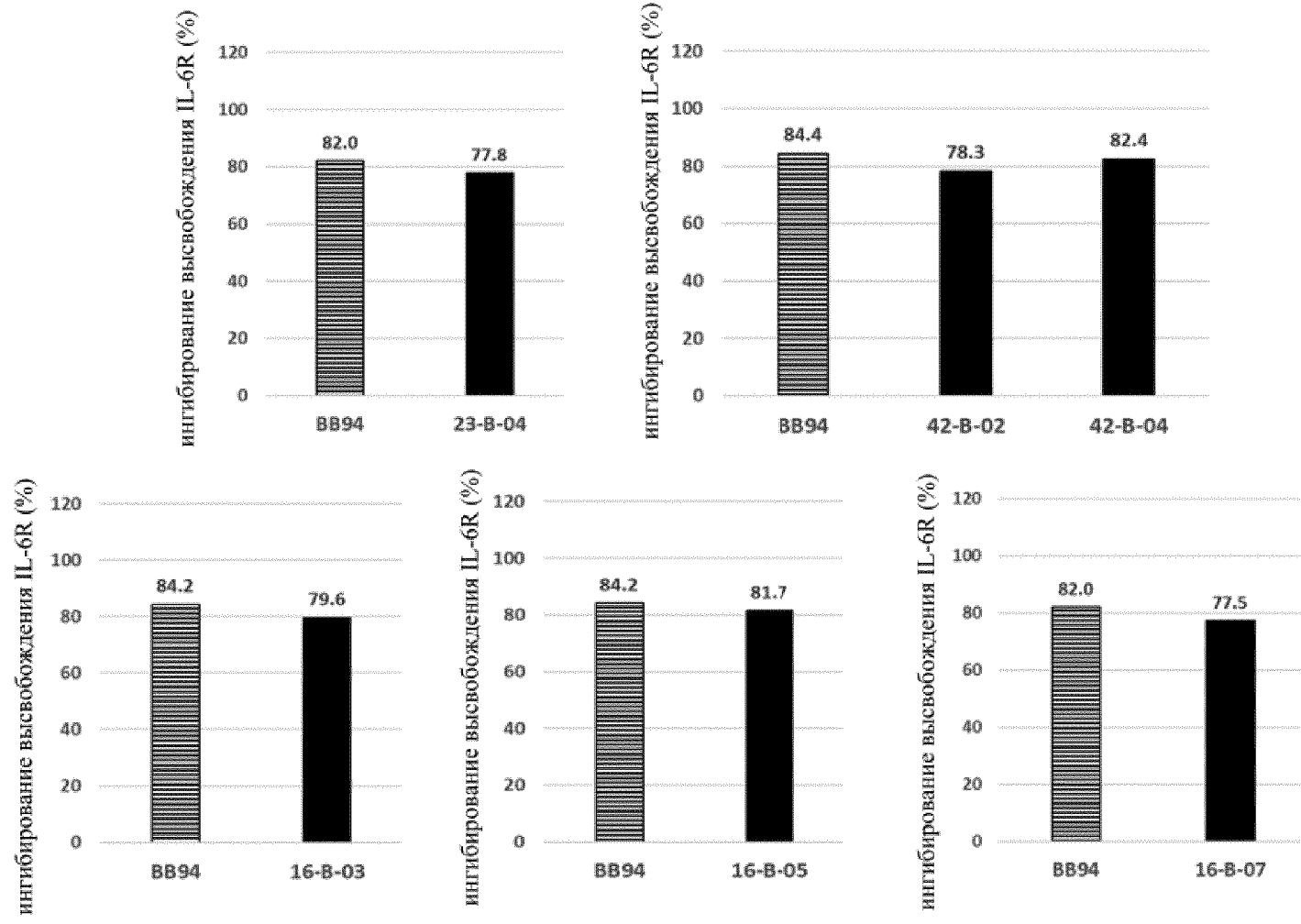
Фиг. 10б



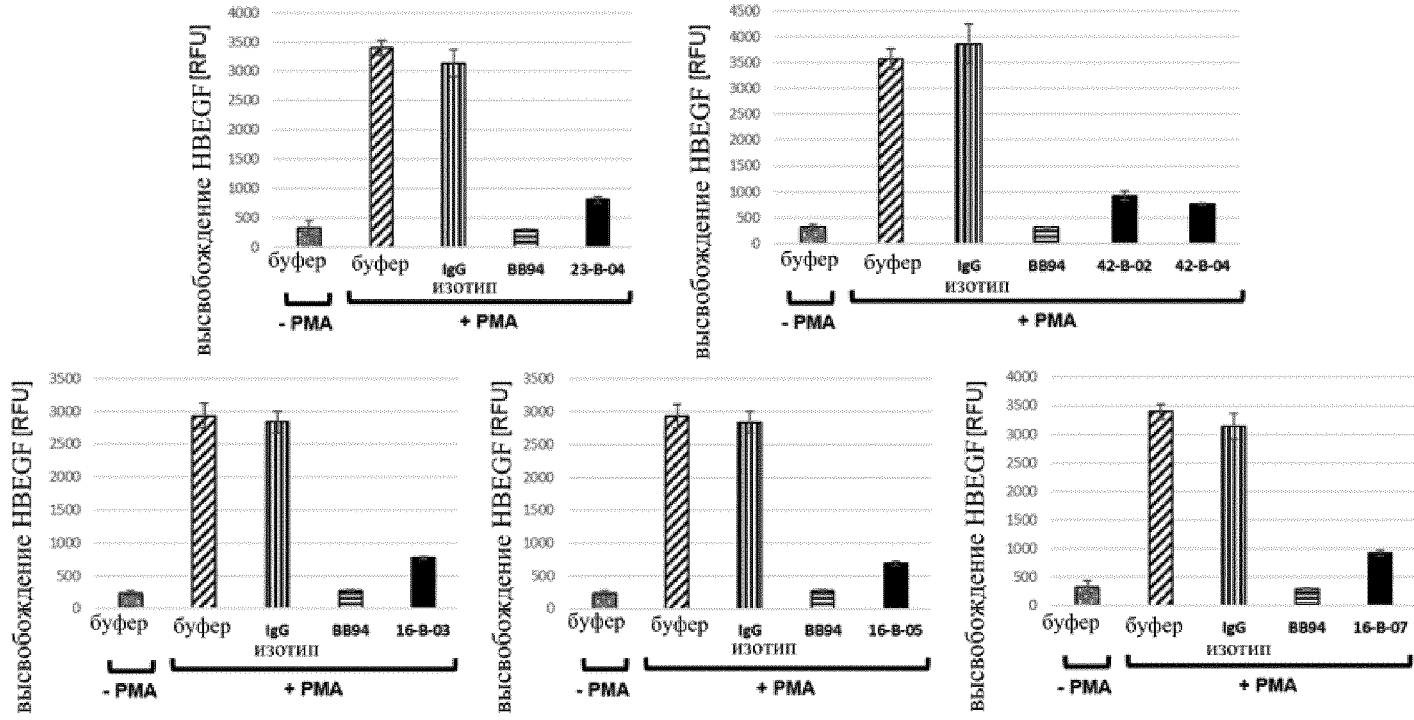
Фиг. 11а



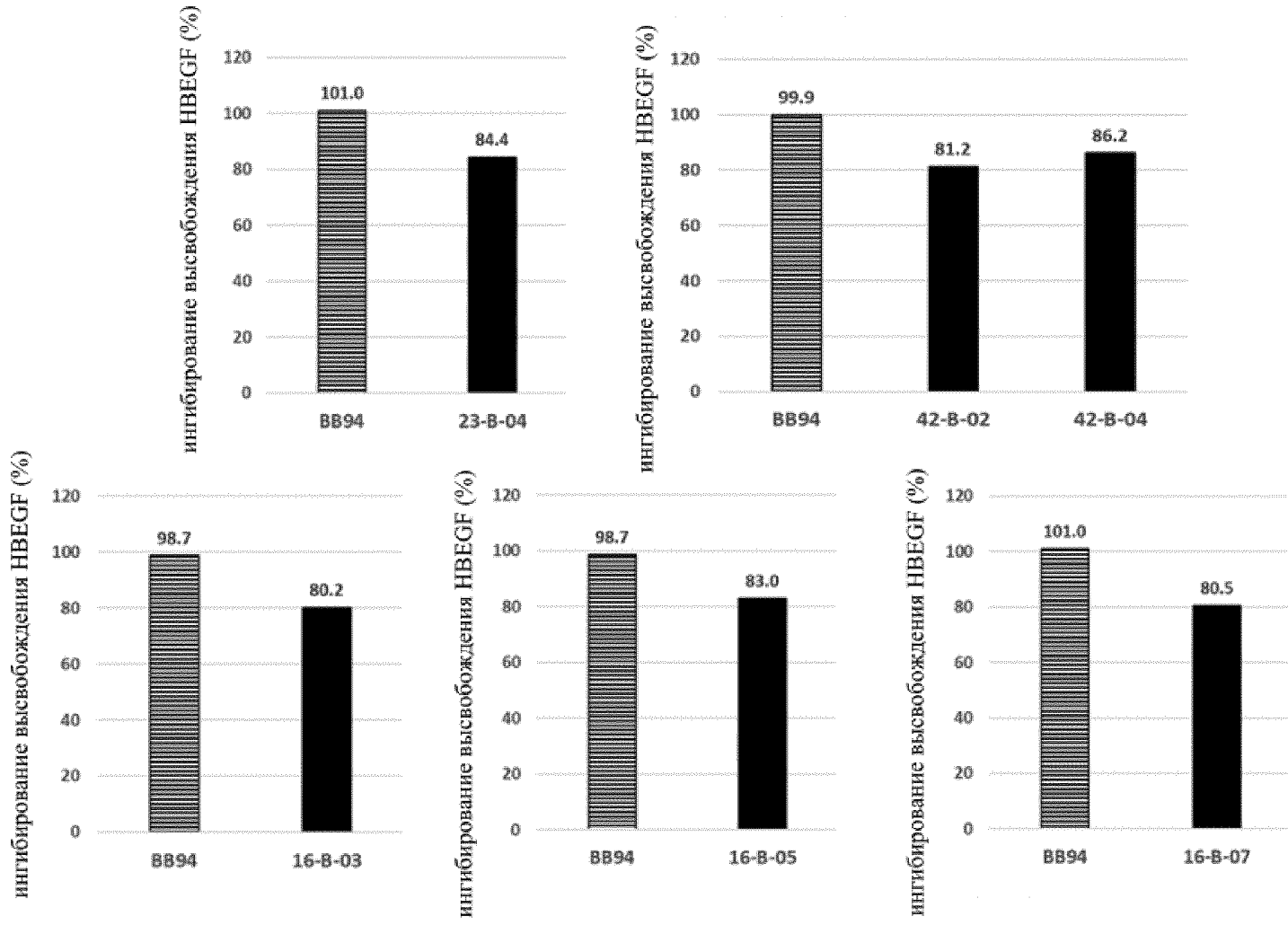
Фиг. 11б



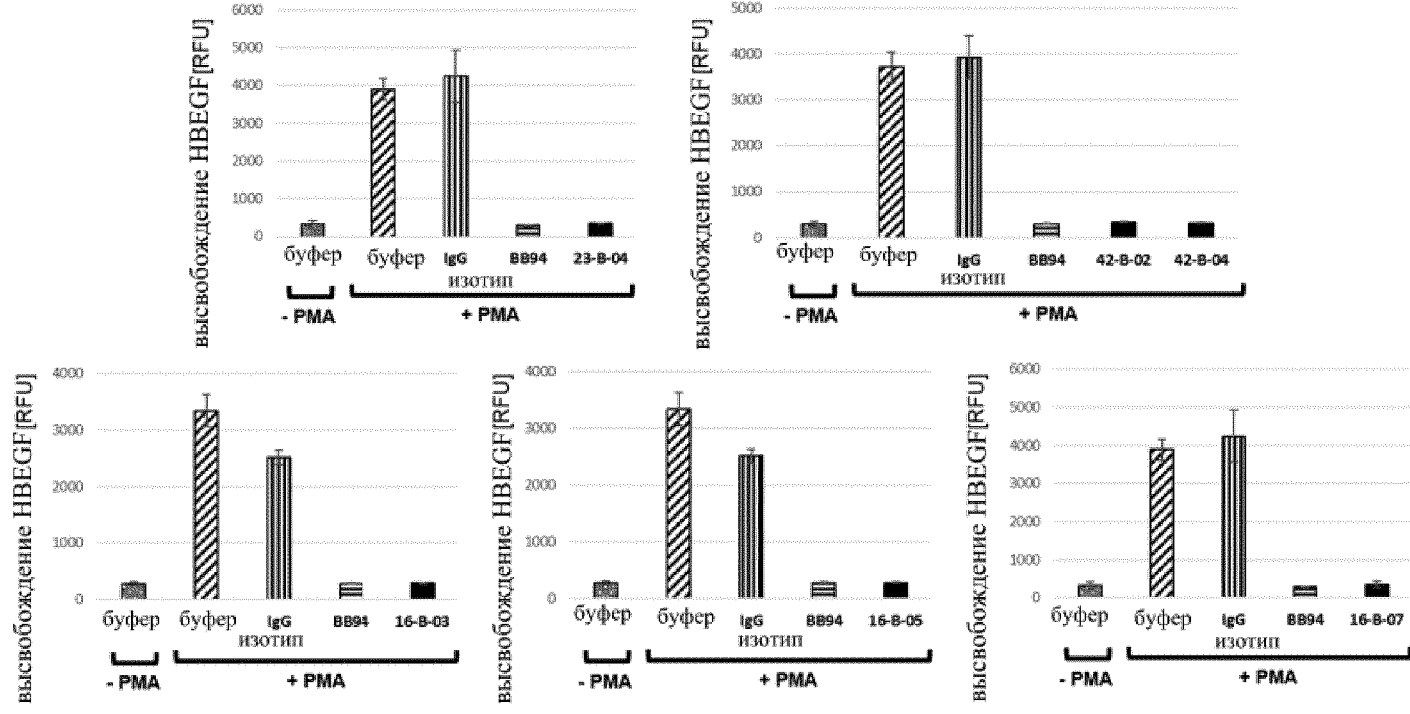
Фиг. 12а



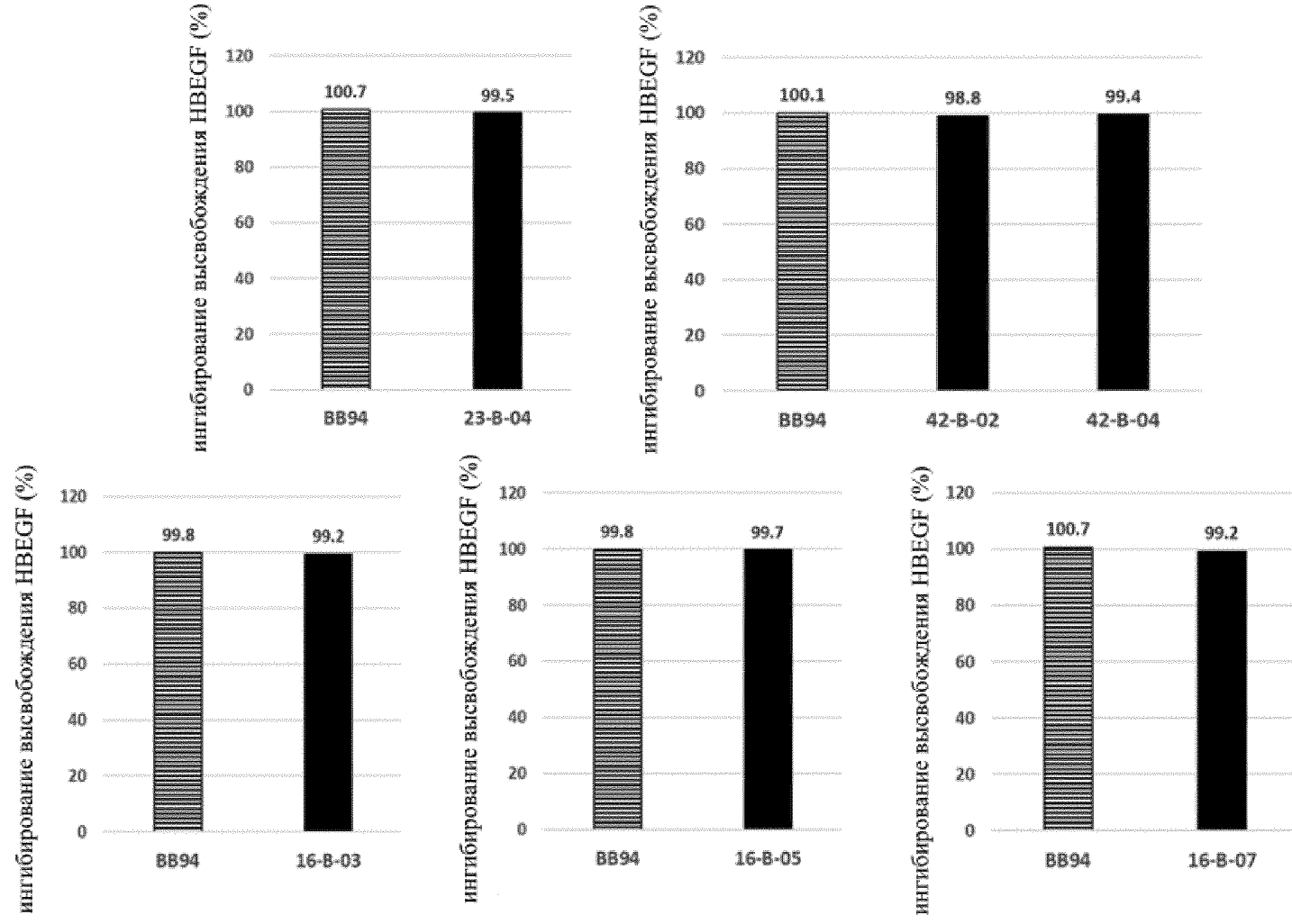
Фиг. 12б



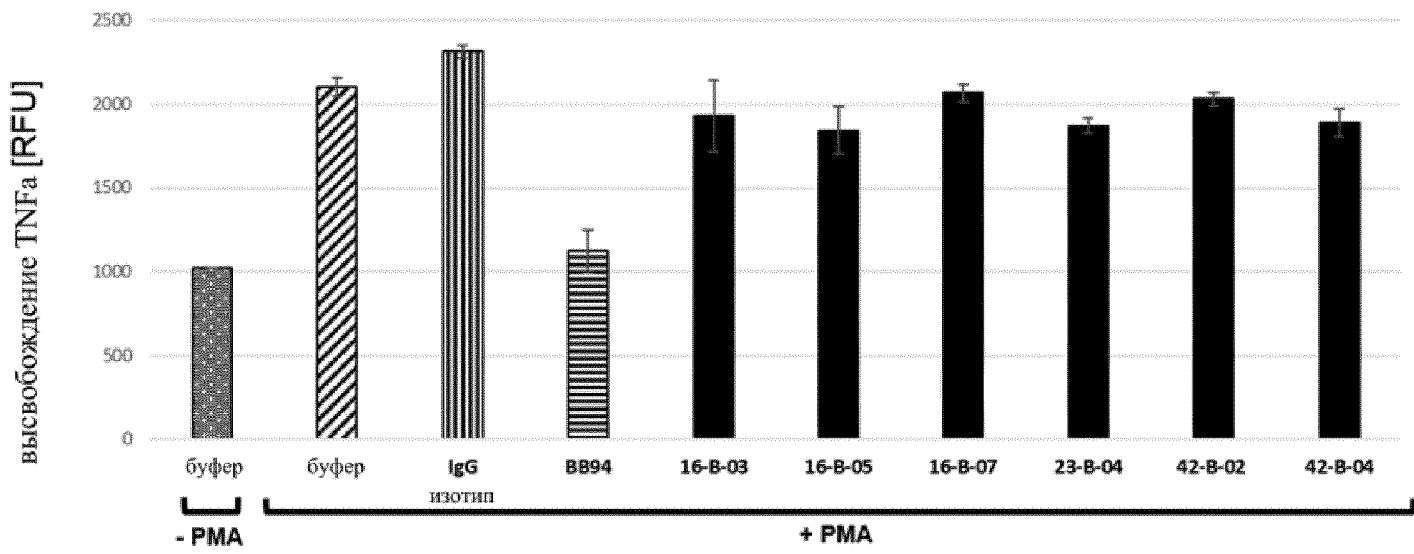
Фиг. 13а



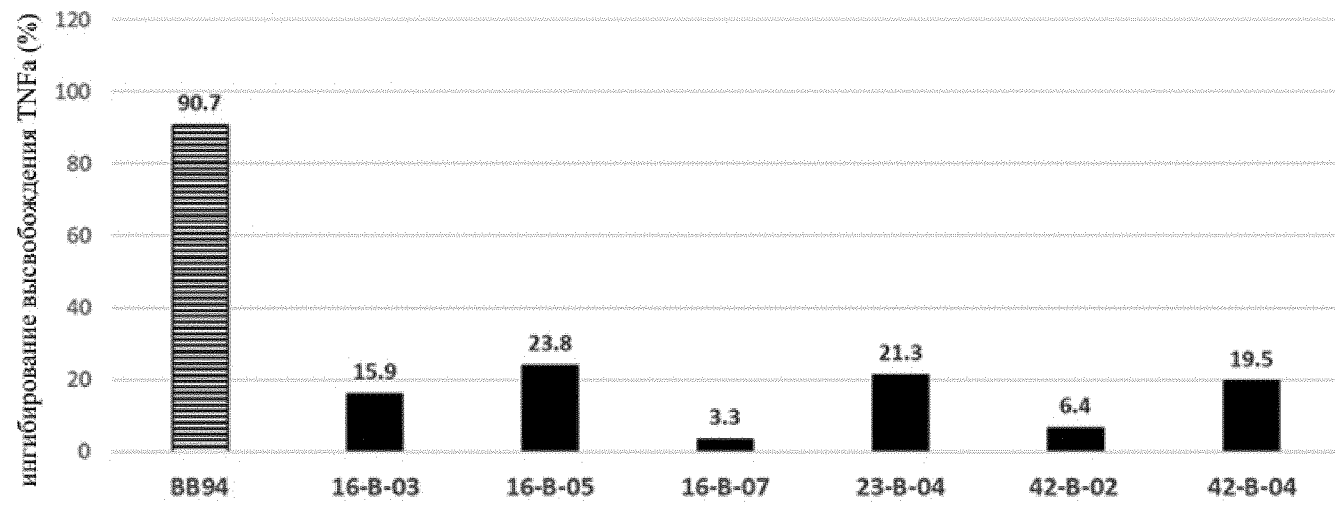
Фиг. 13б



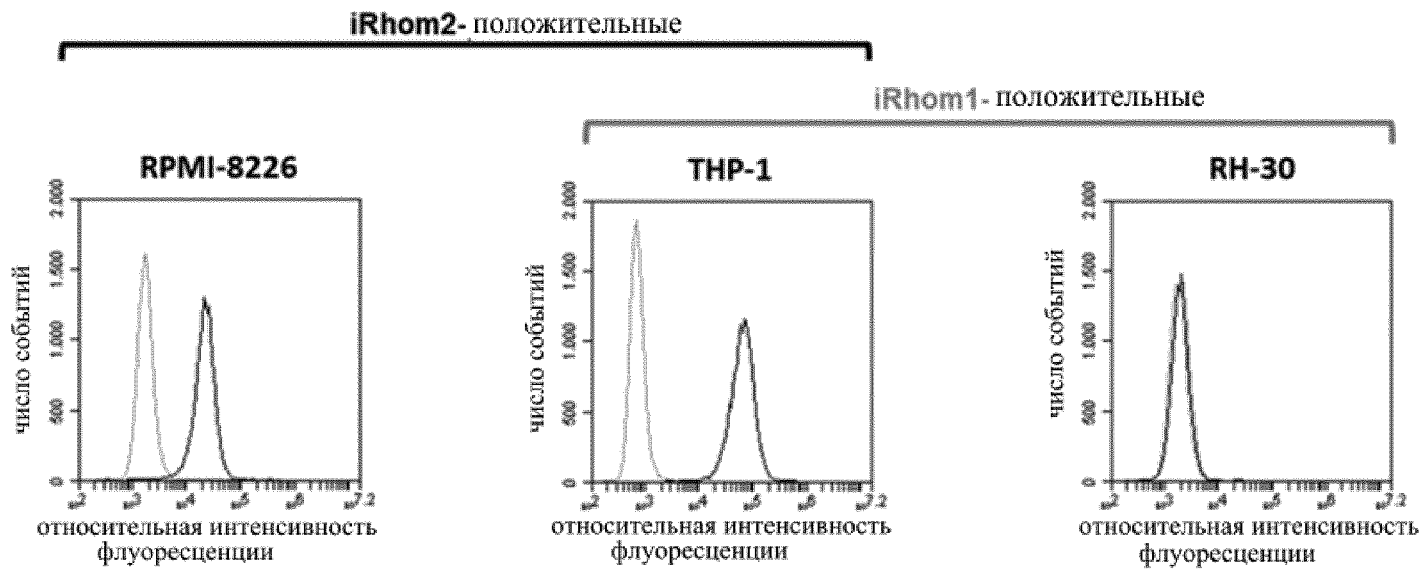
Фиг. 14а



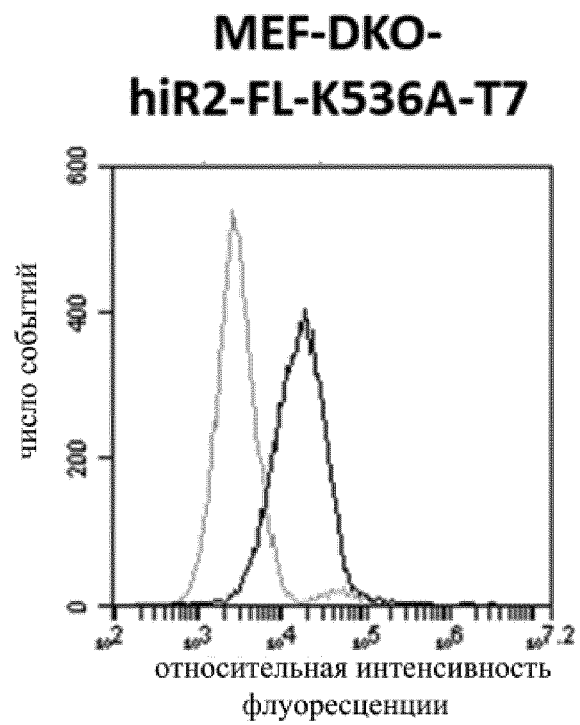
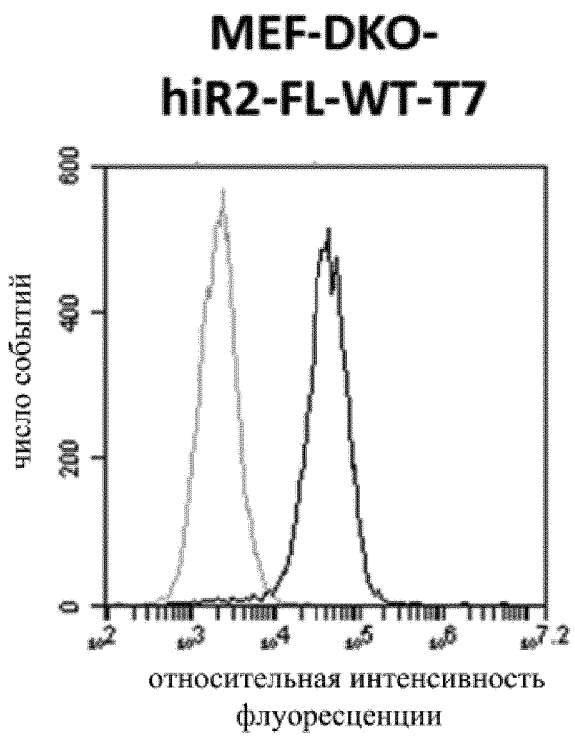
Фиг. 14б



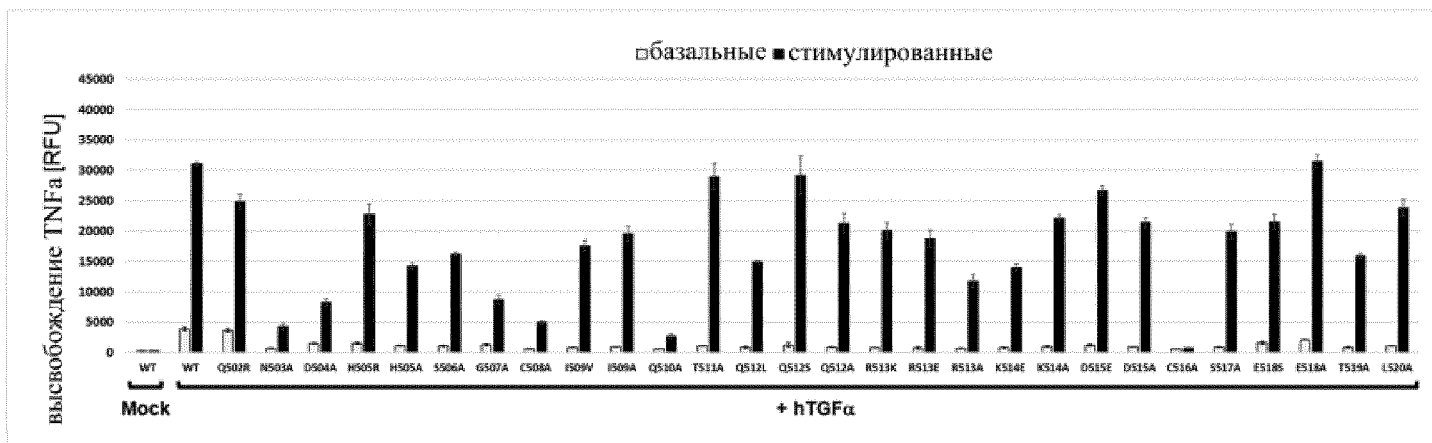
Фиг. 15



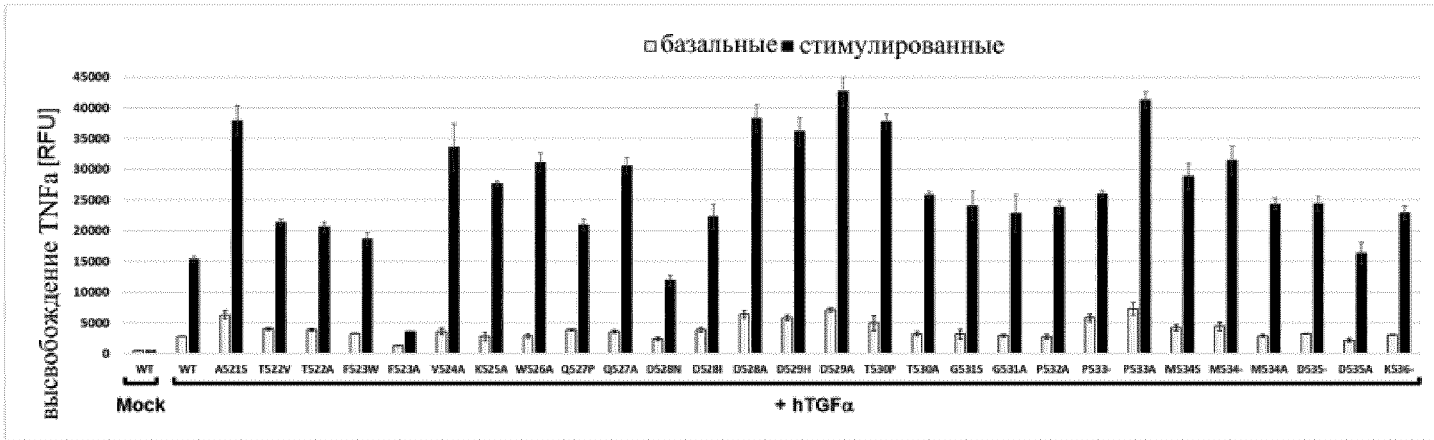
Фиг. 16a



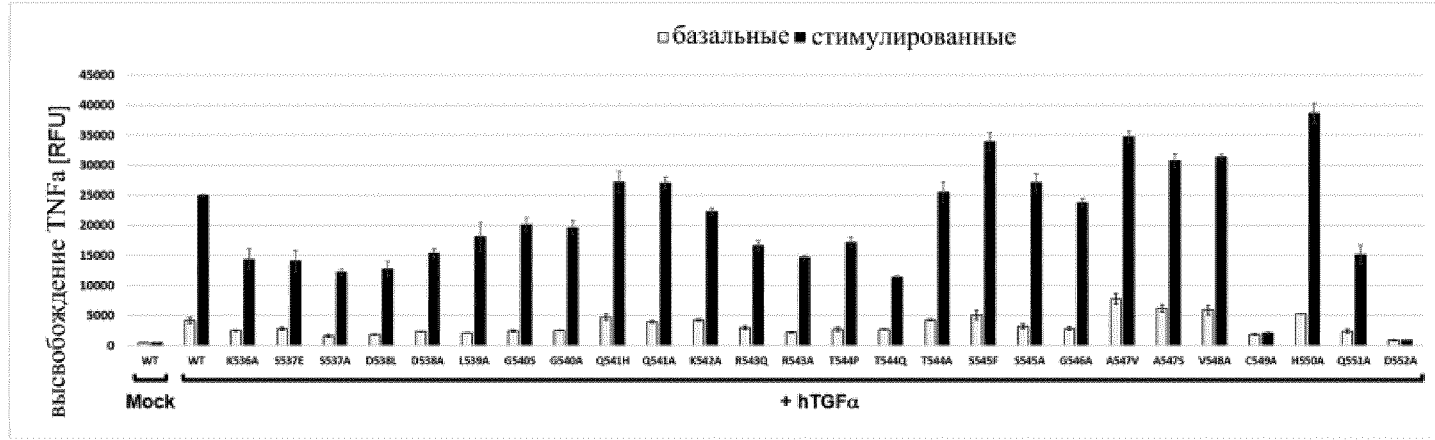
Фиг. 16b



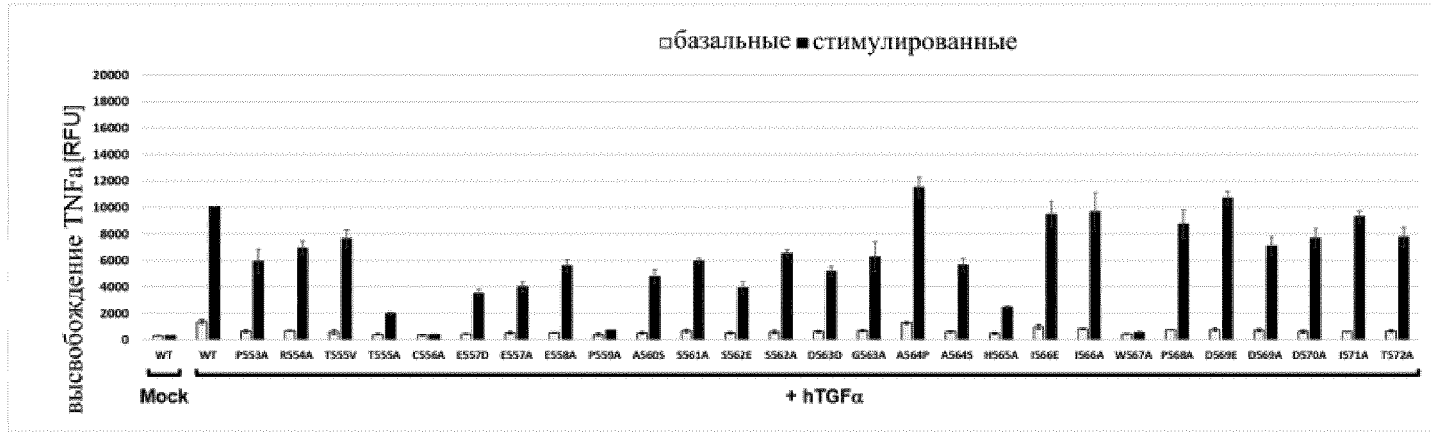
Фиг. 16b (продолжение)



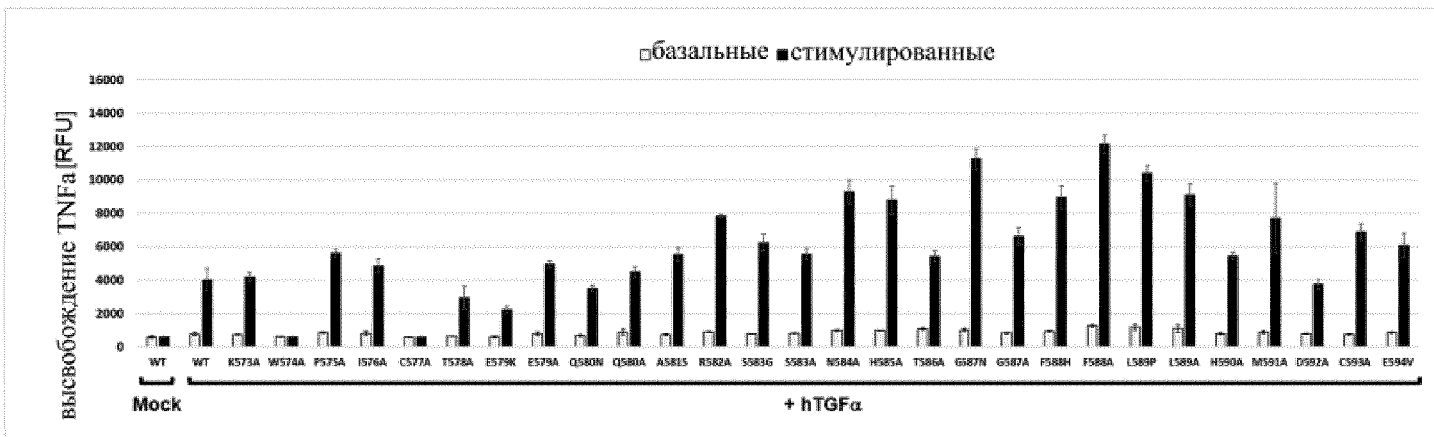
Фиг. 16b (продолжение)



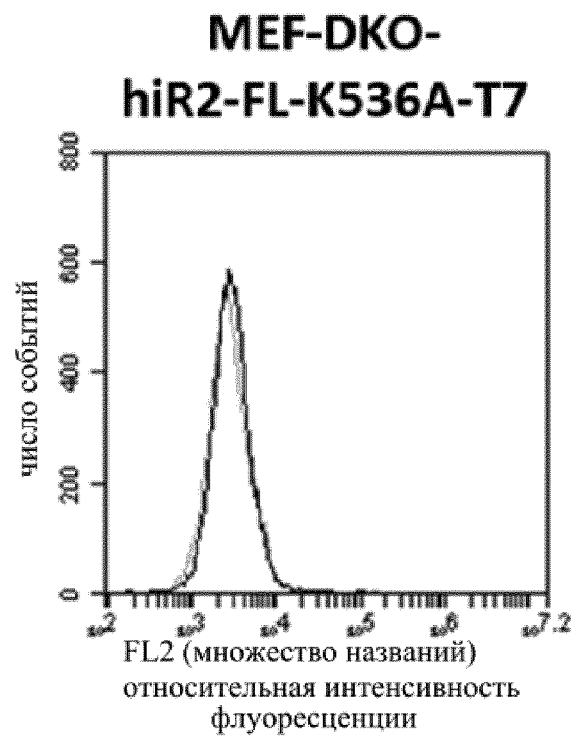
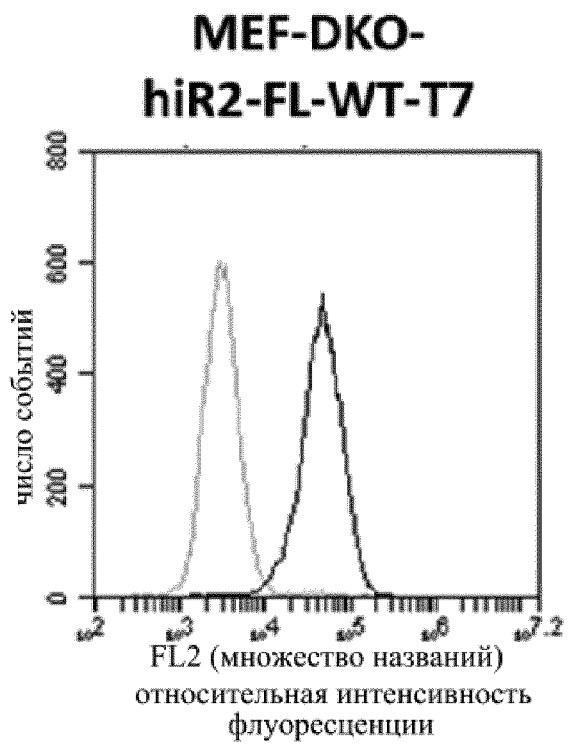
Фиг. 16b (продолжение)



Фиг. 16b (продолжение)



Фиг. 17а



1 => 30% потери связывания по сравнению с диким типом	iRhom2 человека с делециями/заменами					
2 => 60% потери связывания по сравнению с диким типом	клоны гуманизированного антитела					
3 => 95% потери связывания по сравнению с диким типом	#16-B-03	#16-B-05	#16-B-07	#23-B-04	#42-B-02	#42-B-04
Q502R	-	-	-	-	-	-
N503A	1	1	1	1	1	1
D504A	-	-	-	-	-	-
H505R	-	-	-	-	-	-
H505A	-	-	-	-	-	-
S506A	-	-	-	-	-	-
G507A	-	-	-	-	-	-
C508A	1	1	1	2	2	1
I509V	-	-	-	-	-	-
I509A	-	-	-	-	-	-
Q510A	-	-	-	-	-	-
T511A	-	-	-	-	-	-
Q512L	-	-	-	-	-	-
Q512S	-	-	-	-	-	-
Q512A	-	-	-	-	-	-
R513K	-	-	-	-	-	-
R513E	-	-	-	-	-	-
R513A	-	-	-	-	-	-
K514E	-	-	-	-	-	-
K514A	-	-	-	-	-	-
D515E	-	-	-	-	-	-
D515A	-	-	-	-	-	-
S517A	-	-	-	-	-	-
E518S	-	-	-	-	-	-
E518A	-	-	-	-	-	-
T519A	-	-	-	-	-	-

Фиг. 17b

1 => 30% потери связывания по сравнению с диким типом	iRhom2 человека с делециями/заменами					
2 => 60% потери связывания по сравнению с диким типом	клоны гуманизированного антитела					
3 => 95% потери связывания по сравнению с диким типом	#16-B-03	#16-B-05	#16-B-07	#23-B-04	#42-B-02	#42-B-04
L520A	-	-	-	-	-	-
A5215	-	-	-	-	-	-
T522V	-	-	-	-	-	-
T522A	-	-	-	-	-	-
F523W	-	-	-	-	-	-
V524A	-	-	-	-	-	-
K525A	-	-	-	-	-	-
W526A	1	1	1	1	1	1
Q527P	1	1	1	1	1	1
Q527A	-	-	-	-	-	-
D528N	-	-	-	-	-	-
D528I	-	-	-	1	-	1
D528A	-	-	-	1	-	1
D529H	-	-	-	1	1	1
D529A	-	-	1	-	-	1
T530P	1	1	1	1	1	1
T530A	-	-	-	1	-	1
G531S	1	1	1	1	1	1
G531A	-	1	1	-	-	-
P532A	1	1	1	2	1	1
P533-	3	3	3	3	3	3
P533A	-	1	1	1	1	1
M534S	-	1	-	1	1	1
M534-	3	3	3	3	3	3
M534A	-	1	1	1	1	1

Фиг. 17b (продолжение)

1 => 30% потери связывания по сравнению с диким типом	iRhom2 человека с делециями/заменами					
2 => 60% потери связывания по сравнению с диким типом	клоны гуманизированного антитела					
3 => 95% потери связывания по сравнению с диким типом	#16-B-03	#16-B-05	#16-B-07	#23-B-04	#42-B-02	#42-B-04
D535-	3	3	3	3	3	3
D535A	1	1	1	2	2	1
K536-	3	3	3	3	3	3
K536A	3	3	3	3	3	3
S537E	-	-	-	2	2	2
S537A	-	-	-	-	-	-
D538L	-	-	-	-	-	-
D538A	-	-	-	-	-	-
L539A	2	1	2	3	3	3
G540S	-	-	-	-	-	-
G540A	-	-	-	-	-	-
Q541H	-	-	-	-	-	-
Q541A	-	-	-	-	-	-
K542A	1	1	1	-	-	-
R543Q	1	1	1	2	2	2
R543A	1	1	1	3	2	2
T544P	1	1	1	1	1	1
T544Q	-	-	-	-	-	-
T544A	-	-	-	-	-	-
S545F	-	-	-	-	-	-
S545A	-	-	-	-	-	-
G546A	1	1	1	1	1	1
A547V	-	-	-	-	-	-
A547S	-	-	-	-	-	-
V548A	-	-	-	-	-	-
H550A	-	-	-	-	-	-

Фиг. 17b (продолжение)

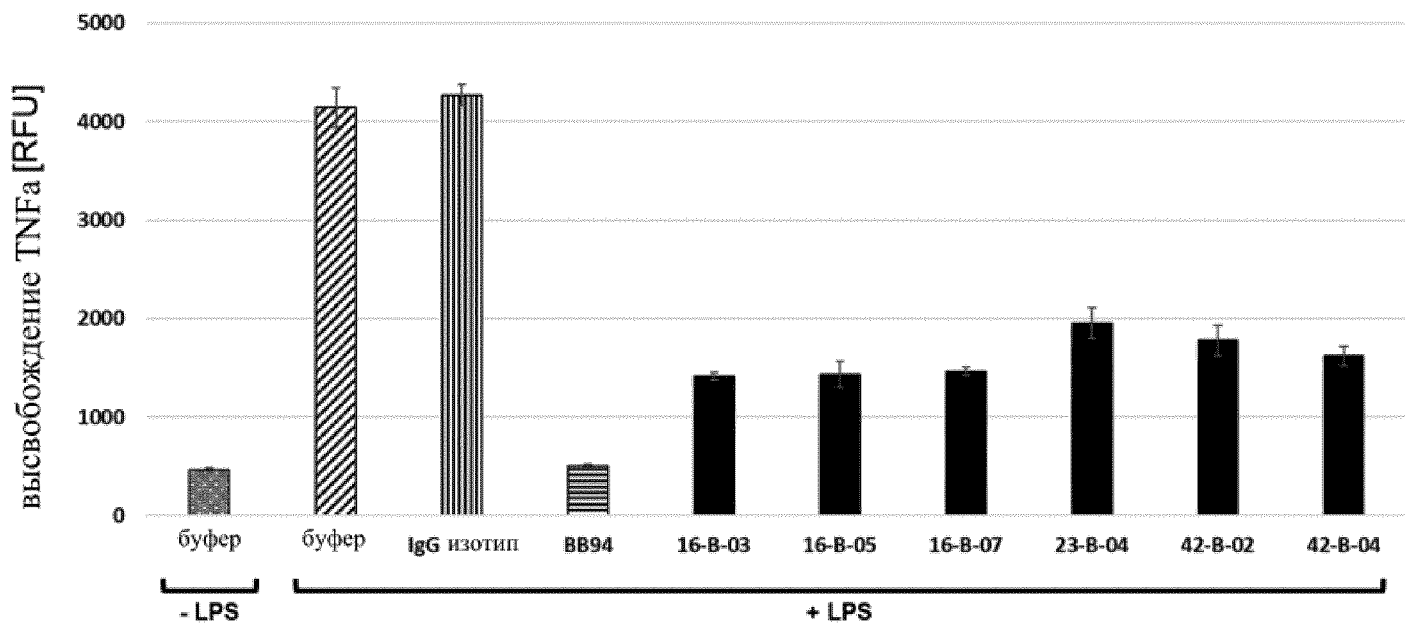
1 => 30% потери связывания по сравнению с диким типом	iRhom2 человека с делециями/заменами					
2 => 60% потери связывания по сравнению с диким типом	клоны гуманизированного антитела					
3 => 95% потери связывания по сравнению с диким типом	#16-B-03	#16-B-05	#16-B-07	#23-B-04	#42-B-02	#42-B-04
Q551A	-	-	-	-	-	-
P553A	-	-	-	-	-	-
R554A	-	-	-	-	-	-
T555V	-	-	-	-	-	-
T555A	-	-	-	-	-	-
E557D	-	-	-	-	-	-
E557A	-	-	-	-	-	-
E558A	-	-	-	-	-	-
A560S	-	-	-	-	-	-
S561A	-	-	-	1	-	-
S562E	-	-	-	-	-	-
S562A	-	-	-	-	-	-
G563D	-	-	-	-	-	-
G563A	-	-	-	-	-	-
A564P	-	-	-	-	-	-
A564S	-	-	-	-	-	-
H565A	-	-	-	-	-	-
I566E	-	-	-	2	1	1
I566A	-	-	-	-	-	-
P568A	-	-	-	-	-	-
D569E	-	-	-	-	-	-
D569A	-	-	-	-	-	-
D570A	-	-	-	-	-	-
I571A	-	-	-	-	-	-
T572A	-	-	-	-	-	-
K573A	-	-	-	-	-	-

Фиг. 17b (продолжение)

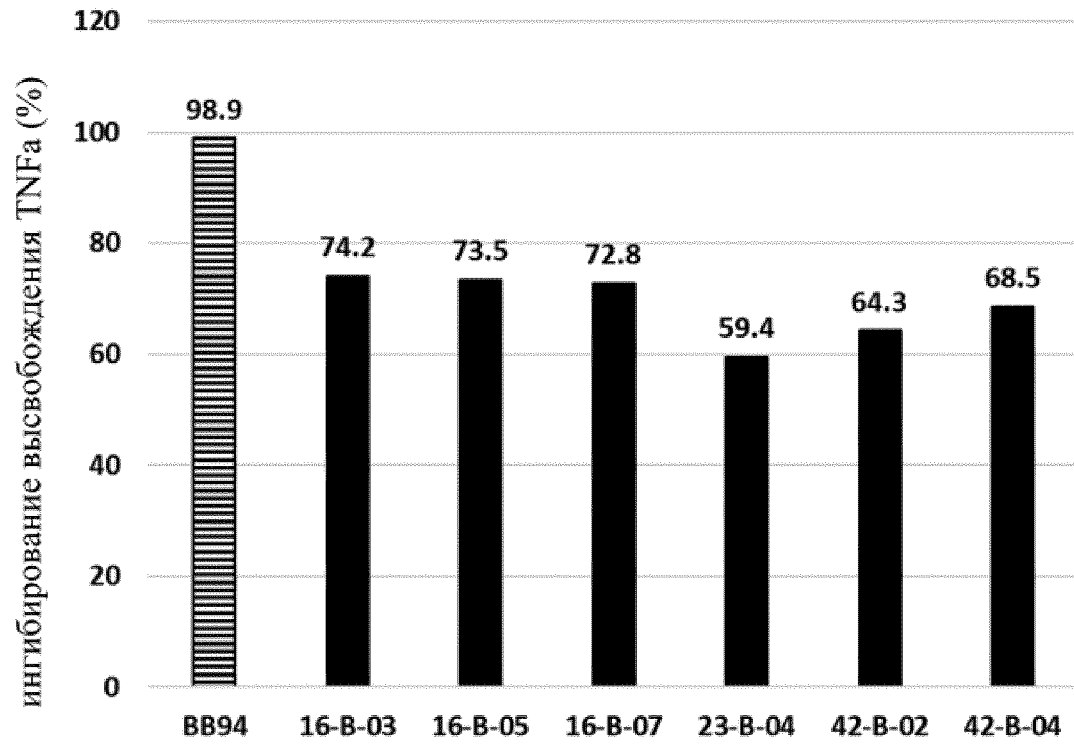
1 => 30% потери связывания по сравнению с диким типом	iRhom2 человека с делециями/заменами					
2 => 60% потери связывания по сравнению с диким типом	клоны гуманизированного антитела					
3 => 95% потери связывания по сравнению с диким типом	#16-B-03	#16-B-05	#16-B-07	#23-B-04	#42-B-02	#42-B-04
P575A	-	-	-	-	-	-
I576A	-	-	-	-	-	-
T578A	-	-	-	-	-	-
E579K	-	-	-	-	-	-
E579A	-	-	-	-	-	-
Q580N	-	-	-	-	-	-
Q580A	-	-	-	-	-	-
A581S	-	-	-	-	-	-
R582A	-	-	-	-	-	-
S583G	-	-	-	-	-	-
S583A	-	-	-	-	-	-
N584A	-	-	-	-	-	-
H585A	-	-	-	-	-	-
T586A	-	-	-	-	-	-
G587N	-	-	-	-	-	-
G587A	-	-	-	-	-	-
F588H	-	-	-	-	-	-
F588A	-	-	-	-	-	-
L589P	-	-	-	-	-	-
L589A	-	-	-	-	-	-
H590A	-	-	-	-	-	-
M591A	-	-	-	-	-	-
D592A	-	-	-	-	-	-
C593A	-	-	-	-	-	-
E594V	-	-	-	-	-	-

Фиг. 17b (продолжение)

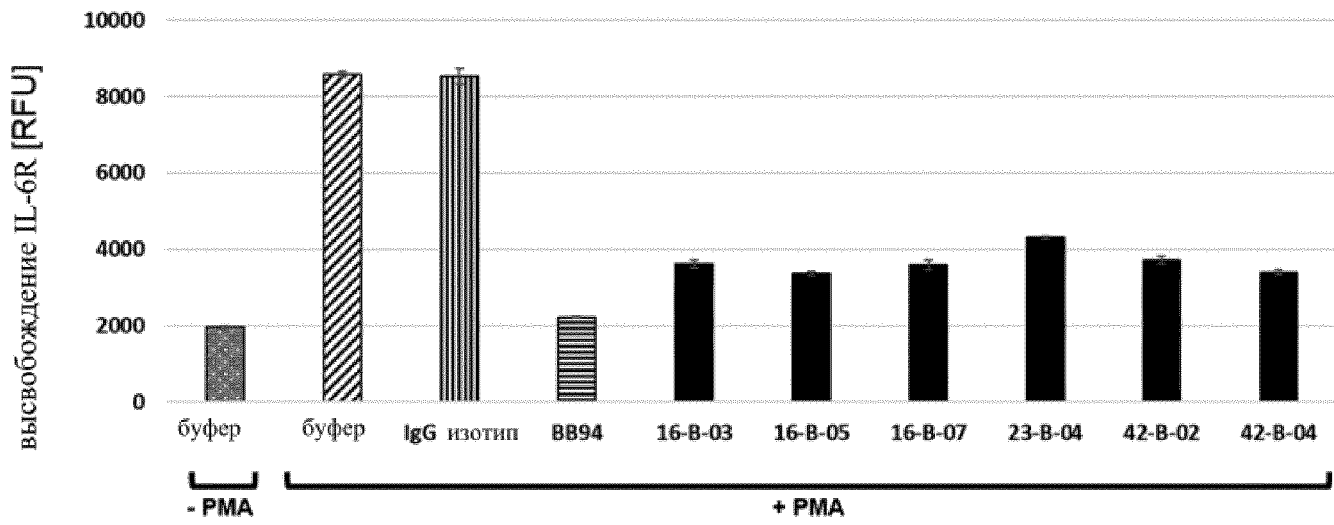
Фиг. 18а



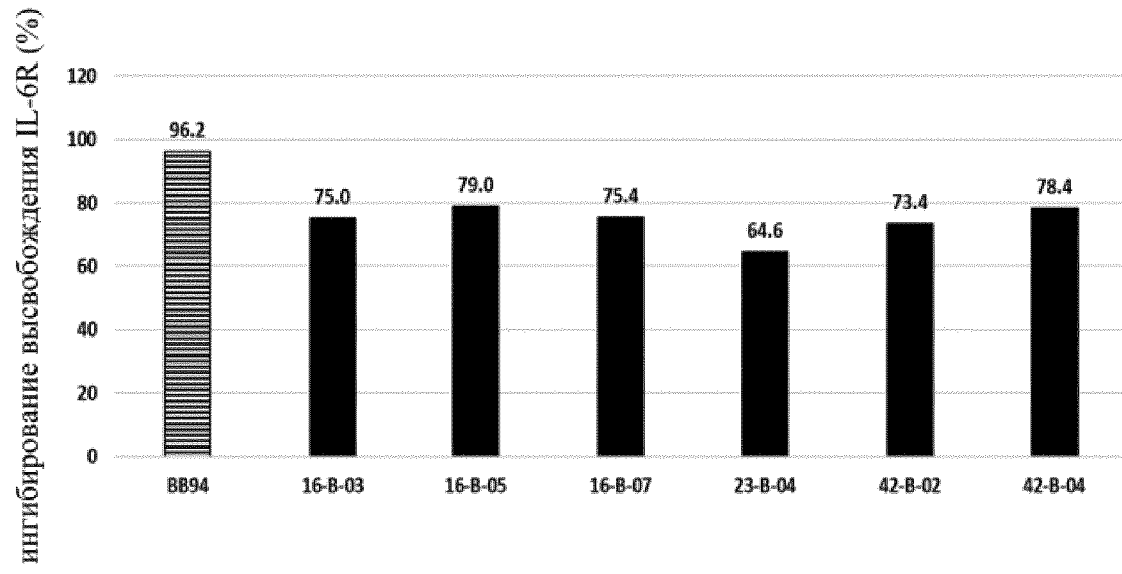
Фиг. 18b



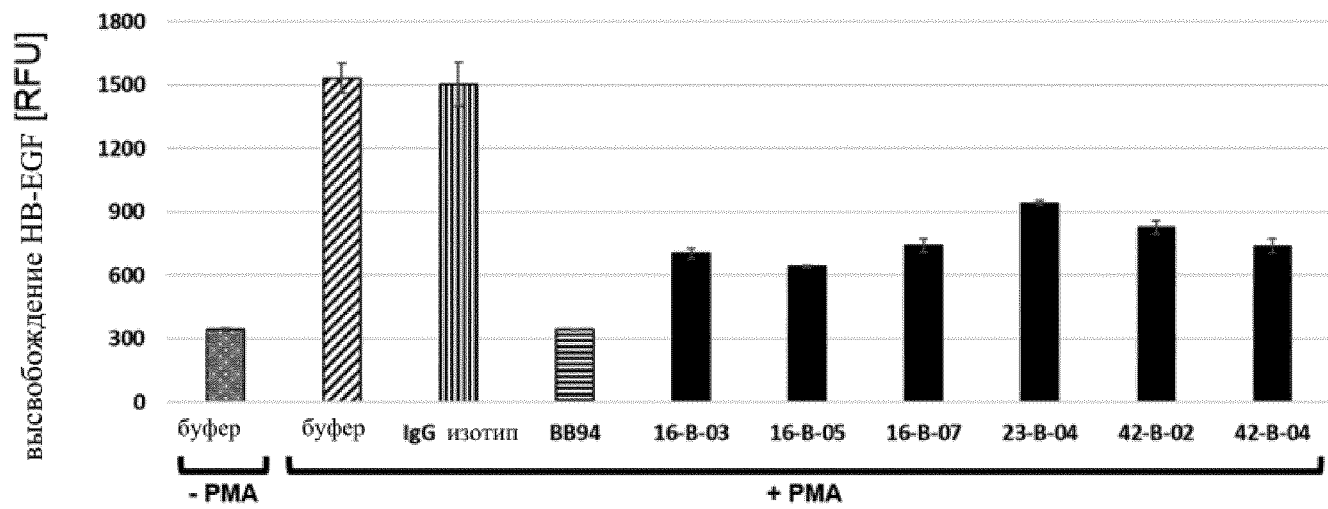
Фиг. 19а



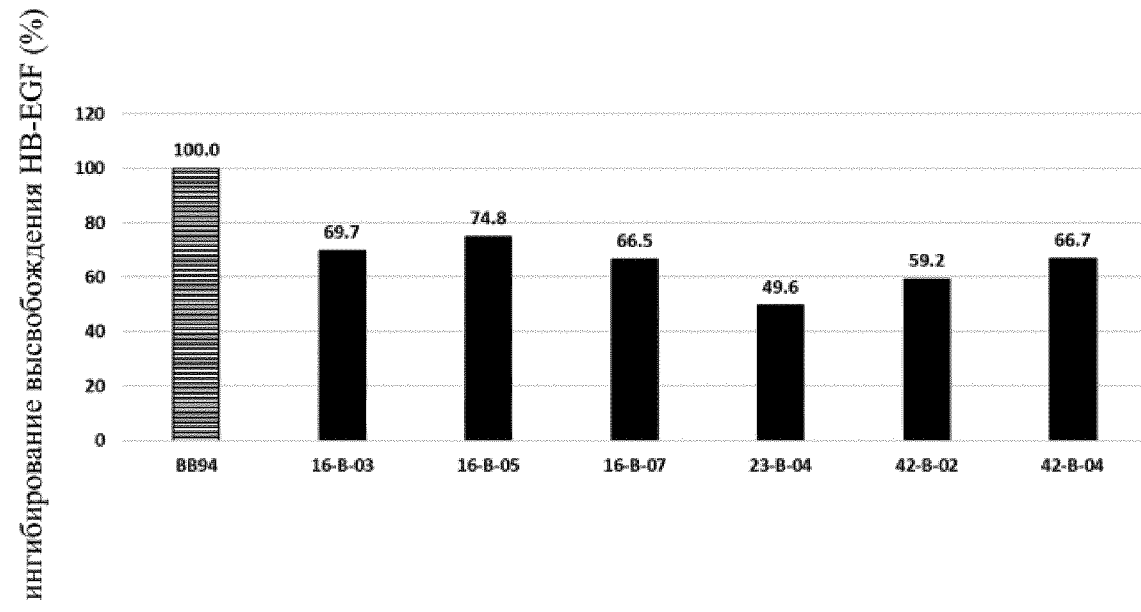
Фиг. 19b



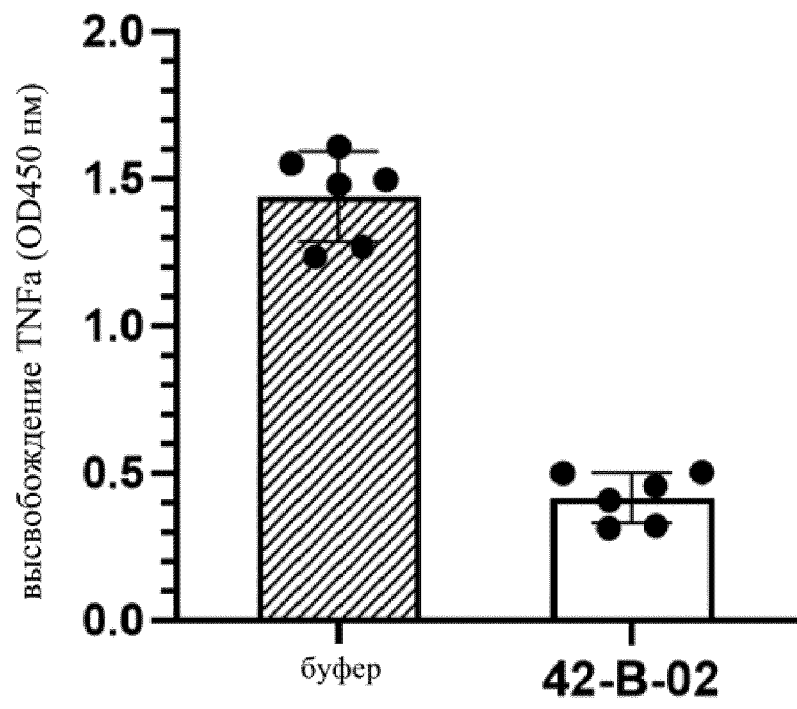
Фиг. 20а



Фиг. 20b



Фиг. 21а



Фиг. 21б

