(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 047057 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.29

(21) Номер заявки
202390432

(22) Дата подачи заявки
2021.08.03

(51) Int. Cl. ***C07K 16/26*** (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА INSL5 ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

(31) **63/060,701**
(32) **2020.08.04**
(33) **US**
(43) **2023.04.06**
(86) **PCT/US2021/044304**
(87) **WO 2022/031674 2022.02.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Вердино Петра, Янг Хсиу-Чиунг (US)

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

(56) WO-A1-2019157774
LI SHI-BING ET AL.: "Autocrine INSL5 promotes tumor progression and glycolysis via activation of STAT5 signaling", EMBO MOLECULAR MEDICINE, vol. 12, 12 July 2020 (2020-07-12), page e12050, XP055857830, Retrieved from the Internet: URL:https://www.embopress.org/doi/epdf/10. 15252/emmm.202012050> the whole document, in particular page 14, right-hand column, third paragraph-page 15, left-hand column, first paragraph
Anonymous: "ImmunotagTM INSL5 polyclonal antibody", 1 January 2018 (2018-01-01), pages 1-2, XP055857943, Retrieved from the Internet: URL:https://www.gbiosciences.com/ITN0234, the whole document

(57) В настоящем изобретении предложены соединения и способы, направленные на инсулиноподобный пептид-5 (INSL5), включая антитела, клетки и векторы, содержащие ДНК, кодирующую их, и способы получения антител. Кроме того, в настоящем изобретении предложено применение антител INSL5 в диагностических анализах.

047057 B1

047057 B1

Настоящее изобретение относится к области медицины. Более конкретно, настоящее изобретение относится к соединениям, средствам диагностики и способам, которые включают антитело или его фрагмент, направленные против инсулиноподобного пептида-5 человека или мыши (INSL5). Ожидается, что соединения и способы по настоящему изобретению будут полезны в области онкологии, репродуктивных и метаболических заболеваний, например, диабета и ожирения, включая диагностику, относящуюся к ним.

Гормон желудочно-кишечного тракта INSL5 принадлежит к семейству релаксинов/инсулиноподобных пептидов. Как и другие члены семейства INSL, INSL5 состоит из B- и A-цепей, соединенных двумя дисульфидными связями. INSL5 экспрессируется в различных тканях; однако он в основном секретируется вместе с другими гормонами из специализированных энтероэндокринных клеток (ЭЭК), называемых L-клетками, в дистальном отделе кишечника, особенно в толстой и прямой кишке. Эти клетки регулируют метаболические и физиологические процессы, такие как перистальтика кишечника, секреция гормонов, гомеостаз глюкозы и аппетит. INSL5 является лигандом для рецептора RXFR4/GPCR142/GPR100, и его взаимодействие между рецептором и лигандом приводит к ингибированию внутриклеточных уровней цАМФ. В то время как INSL5 считается орексигенным (стимулирующим аппетит) гормоном, и его секреция повышается при ограничении калорий, биологические последствия активируемого сигнального пути INSL5-RXFP4 остаются в значительной степени неуловимыми.

Для изучения INSL5 необходимы надежные и чувствительные анализы на INSL5. INSL5 изучали у пациентов с метаболической дисфункцией, синдромом поликистоза яичников (PCOS), колоректальным раком (CRC) и бесплодием, а также на доклинических моделях этих заболеваний. Однако остается потребность в антителах, которые связывают INSL5 человека и мыши, для дальнейшего изучения этих эффектов. В частности, сохраняется потребность в антителах против INSL5 с высокой аффинностью к INSL5 как человека, так и мыши. Доступные в настоящее время анализы имеют проблемы с чувствительностью, воспроизводимостью, производительностью и/или количественными показателями. Таким образом, необходимы дополнительные способы тестирования образцов человека или мыши.

В конкретном варианте реализации настоящего изобретения предложены антитела, которые связывают INSL5, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2, и HCDR3, и VL содержит определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, при этом HCDR1 содержит TASGFSLSSYDMG (SEQ ID NO: 10), HCDR2 содержит TISAGGYTY (SEQ ID NO: 11), HCDR3 содержит ARERWNYDRSGGAGAGYFDL (SEQ ID NO: 12), LCDR1 содержит QASQSITSSYLS (SEQ ID NO: 14), LCDR2 содержит YPAANLAS (SEQ ID NO: 15), и LCDR3 содержит LYGYFSSSIDFA (SEQ ID NO: 16).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитела по настоящему изобретению содержат VH, которая содержит SEQ ID NO: 9, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 13. Согласно некоторым вариантам реализации антитела по настоящему изобретению содержат тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 5, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам реализации антитела по настоящему изобретению содержат тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислоты 2-446 SEQ ID NO: 5, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам реализации антитела по настоящему изобретению содержат HC, состоящую из SEQ ID NO: 5, и LC, состоящую из SEQ ID NO: 7.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7, или обе. Согласно некоторым вариантам реализации один или более векторов содержат одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7, или обе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к композиции, содержащей первый вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 5, и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 7. Согласно другим вариантам реализации в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 7. В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к клетке, содержащей один или более векторов, содержащих одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7, или обе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к клетке, содержащей первый вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 5, и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 7.

Согласно другим вариантам реализации в настоящем изобретении предложена клетка, содержащая вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 5, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 7. В дополнительных вариантах реализации клетка представляет собой клетку млекопитающего.

В конкретном варианте реализации настоящего изобретения предложены антитела, которые связывают INSL5, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) HCDR1,

HCDR2, и HCDR3, и VL содержит определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, при этом HCDR1 содержит TVSGIDLTTYAMG (SEQ ID NO: 22), HCDR2 содержит IIGGGGRTY (SEQ ID NO: 23), HCDR3 содержит VRGGDFFDL (SEQ ID NO: 24), LCDR1 содержит QASEDISKYLS (SEQ ID NO: 26), LCDR2 содержит YYVSNLEF (SEQ ID NO: 27), и LCDR3 содержит HQGYTGVNVENV (SEQ ID NO: 28).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитела по настоящему изобретению содержат VH, которая содержит SEQ ID NO: 21, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 25. В другом варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению содержат тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 17, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах реализации антитела по настоящему изобретению содержат тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислоты 2-435 SEQ ID NO: 17, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 19. Согласно некоторым вариантам реализации антитела по настоящему изобретению содержат HC, состоящую из SEQ ID NO: 17, и LC, состоящую из SEQ ID NO: 19.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19, или обе. Согласно некоторым вариантам реализации один или более векторов содержат одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19, или обе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к композиции, содержащей первый вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 17, и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 19. Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к композиции, содержащей вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 19. В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к клетке, содержащей один или более векторов, содержащих одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19, или обе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к клетке, содержащей первый вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 17, и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 19. Согласно другим вариантам реализации в настоящем изобретении предложена клетка, содержащая вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 17, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 19. В дополнительных вариантах реализации клетка представляет собой клетку млекопитающего.

В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему раскрытию связывают INSL5 человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитела по настоящему изобретению связывают цепь A (SEQ ID NO: 1) и цепь B (SEQ ID NO: 2) INSL5 человека. В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему раскрытию связывают INSL5 мыши. Согласно некоторым вариантам реализации антитела по настоящему изобретению связывают цепь A (SEQ ID NO: 3) и цепь B (SEQ ID NO: 4) INSL5 мыши.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного антитела, и выделение указанного экспрессированного антитела из культуральной среды. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен способ получения антитела, полученного путем культивирования клетки в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного антитела, и выделение указанного экспрессированного антитела из культуральной среды.

Согласно другим вариантам реализации настоящего раскрытия предложен способ обнаружения INSL5 человека или мыши в образце. Такие способы включают стадии приведения образца в контакт с антителом согласно настоящему раскрытию, которое специфично связывает INSL5 мыши, и обнаружения сигнала, путем указанной стадии приведения в контакт.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации предложен способ количественного определения INSL5 человека или мыши в образце. Такие способы включают стадии приведения указанного образца в контакт с антителом согласно настоящему раскрытию, которое специфично связывает INSL5 мыши, и обнаружения сигнала, путем указанной стадии приведения в контакт. В некоторых вариантах реализации такие способы дополнительно содержат стадии приведения контрольного стандарта в контакт с антителом и обнаружения сигнала, обеспечиваемого указанной стадией приведения в контакт с контрольным стандартом.

Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему раскрытию такие способы дополнительно включают стадию количественного определения INSL5 в образце. В таких вариантах реализации стадия количественного определения INSL5 включает количественное определение INSL5 в образце при сравнении с референсным стандартом.

Согласно некоторым вариантам реализации согласно настоящему раскрытию образец представляет собой образец крови, плазмы, сыворотки или спинномозговой жидкости (CSF).

Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему раскрытию, способы дополнительно включают стадию приведения образца в контакт с антителом, которое специфично свя-

зывает INSL5 человека или мыши, и вторым антителом, причем указанное второе антитело также связывает INSL5 человека или мыши. В некоторых таких способах одно из указанного антитела или второго антитела содержит обнаруживаемую метку, и указанная стадия обнаружения включает обнаружение сигнала, обеспечиваемого обнаруживаемой меткой, при образовании комплекса, включающего антитело, второе антитело и INSL5 человека или мыши. Согласно некоторым таким вариантам реализации одно из антитела и второго антитела иммобилизовано на субстрате. В некоторых вариантах реализации способов согласно настоящему раскрытию стадии приведения образца в контакт с антителом и приведения образца в контакт со вторым антителом происходят одновременно. Согласно некоторым более конкретным вариантам реализации второе антитело содержит антитело согласно настоящему раскрытию, которое специфично связывает INSL5 человека или мыши, как описано в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему раскрытию, способы дополнительно включают стадию приведения образца в контакт с антителом, которое специфично связывает INSL5, и вторым антителом, причем указанное второе антитело также специфично связывает INSL5. В некоторых таких способах одно из указанного антитела или второго антитела содержит обнаруживаемую метку, и указанная стадия обнаружения включает обнаружение сигнала, обеспечиваемого обнаруживаемой меткой, при образовании комплекса, включающего антитело, второе антитело и INSL5. Согласно некоторым таким вариантам реализации одно из антитела и второго антитела иммобилизовано на субстрате. В других вариантах реализации второе антитело связывает другой эпитоп INSL5. В некоторых вариантах реализации способов согласно настоящему раскрытию стадии приведения образца в контакт с антителом и приведения образца пациента в контакт со вторым антителом происходят одновременно. В любом из таких вариантов реализации антитело или второе антитело или оба представляют собой антитело, которое связывает INSL5, как описано в настоящем документе.

Термин "антитело" в контексте данного документа относится к молекуле иммуноглобулина, которая связывает антиген. Варианты реализации антитела включают моноклональное антитело, поликлональное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело. Антитела могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA) и любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

Иллюстративное антитело по данному изобретению представляет собой антитело типа иммуноглобулина G (IgG), состоящее из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), которые сшиты посредством межцепочечных дисульфидных связей. Аминоконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей содержит вариабельную область из около 100-125 или более аминокислот, в первую очередь, отвечающую за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей содержит константную область, в первую очередь, отвечающую за эффекторную функцию. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (ВН) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи. Изотип IgG можно дополнительно разделить на подклассы (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4).

Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), перемежающиеся с участками, которые являются более консервативными и называются каркасными участками (FR). CDR экспонируются на поверхности белка и являются важными участками антитела для специфичности связывания антигена. Каждая VL и VH состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В данном случае три CDR тяжелой цепи называются "HCDR1, HCDR2 и HCDR3", и три CDR легкой цепи называются "LCDR1, LCDR2 и LCDR3". CDR содержат большую часть остатков, которые образуют специфичные взаимодействия с антигеном. Отнесение аминокислотных остатков к CDR может быть выполнено в соответствии с хорошо известными схемами, в том числе описанными у Kabat (Kabat et. al, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), Chothia (Chothia et. al., "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et. al., "Standard Conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)), North (North et. al, "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) или IMGT (международной базе данных ImMunoGeneTics, доступной на сайте www.imgt.org; см. Lefranc et. al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212). Назначение аминокислот доменам CDR в областях LCVR и HCVR антител согласно настоящему изобретению основано на North. LC, согласно некоторым вариантам реализации настоящего раскрытия, классифицируются как каппа или лямбда, каждая из которых характеризуется определенной константной областью, известной в данной участки техники. HC, согласно некоторым вариантам реализации настоящего раскрытия, классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, и определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации антитела включают HC IgG, которые можно дополнительно разделить на подклассы, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Карбоксиконцевая часть каждой HC определяет константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию. В конкретном варианте реализации, антитела согласно настоя-

щему изобретению имеют одну или более модификаций в константной участки каждой НС, которые снижают эффекторную функцию.

Антитела согласно настоящему изобретению представляют собой моноклональные антитела. Моноклональные антитела представляют собой антитела, полученные из единственной копии или клона, включая, например, любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не способ, с помощью которого их получают. Моноклональные антитела могут быть получены, например, с помощью гибридомных технологий, рекомбинантных технологий, технологий фагового дисплея, синтетических технологий, например, CDR-трансплантации, или комбинаций таких или других технологий, известных в данной участки техники.

Способы получения и очистки антител хорошо известны в данной участки техники и могут быть найдены, например, в Harlow and Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N.Y., chapters 5-8 and 15, ISBN 0-87969-314-2. Например, мышей или кроликов можно иммунизировать посредством INSL5 человека или мыши, и полученные антитела можно выделить, очистить и определить аминокислотные последовательности с применением обычных способов, хорошо известных в данной участки техники. Аналогичным образом можно проводить скрининг фаговой библиотеки, посредством чего тысячи Fab-фрагментов проверяют на взаимодействие с INSL5 человека или мыши, и полученные в результате взаимодействующие молекулы могут быть выделены, очищены, и аминокислотные последовательности могут быть определены с использованием общепринятых способов, хорошо известных в данной участки техники, с помощью которых могут быть сконструированы исходные антитела.

В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения, антитело или нуклеиновая кислота, кодирующая его, предложена в выделенной форме. В настоящем документе термин "выделенный" относится к белку, пептиду или нуклеиновой кислоте, который(ая) свободен(на) или практически свободен(на) от других макромолекулярных частиц, обнаруженных в клеточной среде.

Термины "связывать" и "связывает" в контексте настоящего документа предназначены для обозначения, если не указано иное, способности белка или молекулы образовывать химическую связь или взаимодействие на основании притяжения с другим белком или молекулой, что приводит к близости двух белков или молекул, как определено обычными методами, известными в данной области техники.

Антитела против INSL5 по настоящему изобретению, которые связывают INSL5 человека или мыши, можно использовать для выделения и/или обнаружения изоформ INSL5 человека или мыши с помощью таких методов, как аффинная хроматография, иммунопреципитация, иммуногистохимия или анализ на основе ELISA. Такой анализ можно применять для обнаружения и/или оценки количества и/или паттернов INSL5 в диагностических, прогностических или тераностических целях для мониторинга уровней полипептидов, например, в сыворотке, плазме, крови или CSF в рамках процедуры клинического исследования, например, для определения эффективности данной схемы лечения. Как понятно из данной участки техники, антитело согласно настоящему изобретению может быть связано с обнаруживаемым веществом или меткой для облегчения его обнаружения. Примеры обнаруживаемых веществ или меток включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, хемилюминесцентные материалы и радиоактивные материалы. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлороназиниламин флуоресцеин (dichlorotnazinylamine fluorescein), дансилхлорид или фикоэритин; пример люминесцентного материала включает люминол; примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин, рутений и экворин, и примеры подходящего радиоактивного материала включают ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S или ^{3}H. Антитела согласно настоящему изобретению также могут быть подходящими для фармакогеномного анализа. Такие варианты реализации можно применять для идентификации индивидуумов, которым могут получать пользу от определенных или модифицированных методов лечения и/или мониторинга эффективности существующих режимов лечения.

"Контрольный стандарт" в настоящем документе относится к образцу, который можно использовать для сравнения результатов, полученных на образце в способах согласно настоящему изобретению. Контрольные стандарты могут представлять собой клетки, кровь, плазму, спинномозговую жидкость, ткань или известные концентрации белка, добавленные в среду. Уровни концентрации в контрольном стандарте могут быть абсолютным или относительным количеством, диапазоном количества или минимальным количеством, средним количеством и/или медианным количеством INSL5. Контрольный стандарт также может служить базовым уровнем INSL5, с которым сравнивают образец пациента. Контрольный стандарт может включать значение концентрации от того же пациента или известный нормальный референс INSL5. Кроме того, в некоторых вариантах реализации контрольный стандарт может экспрессировать концентрации INSL5 в форме стандартной кривой.

В настоящем документе термин "захватывающее антитело" относится к антителу, которое будет связывать INSL5. В таких вариантах реализации захватывающее антитело способно связывать и захваты-

вать INSL5, например, специфично связывать INSL5 в образце в подходящих условиях, так что комплекс захватывающего антитела-INSL5 можно отделить от остальной части образца. В некоторых вариантах реализации захватывающее антитело может представлять собой антитело, которое специфично связывает INSL5, и антитело, которое специфично связывает INSL5, используется в качестве второго (или детектирующего) антитела. В дополнительных вариантах реализации захватывающее антитело представляет собой антитело, предложенное в настоящем документе. В дополнительных вариантах реализации захватывающее антитело представляет собой антитело с HCDR, соответствующей SEQ ID NO: 10-12, и LCDR, соответствующей SEQ ID NO: 14-16, соответственно. В дополнительных вариантах реализации захватывающее антитело представляет собой антитело с HCDR, соответствующей SEQ ID NO: 22-24, и LCDR, соответствующей SEQ ID NO: 26-28, соответственно. В некоторых вариантах реализации захватывающее антитело иммобилизовано. В некоторых вариантах реализации детектирующее антитело мечено обнаруживаемой меткой. В некоторых вариантах реализации второе (или детектирующее) антитело представляет собой антитело, предложенное в настоящем документе. В дополнительных вариантах реализации захватывающее (или детектирующее) антитело представляет собой антитело с HCDR, соответствующей SEQ ID NO: 10-12, и LCDR, соответствующей SEQ ID NO: 14-16, соответственно. В дополнительных вариантах реализации захватывающее (или детектирующее) антитело представляет собой антитело с HCDR, соответствующей SEQ ID NO: 22-24, и LCDR, соответствующей SEQ ID NO: 26-28, соответственно.

В некоторых вариантах реализации захватывающее антитело иммобилизовано в "сэндвич"-иммуноанализе, и захватывающее или первое антитело специфично связывает INSL5 человека или мыши. В некоторых таких вариантах реализации захватывающее антитело представляет собой антитело по настоящему изобретению, которое специфично связывает INSL5 человека или мыши. В дополнительных вариантах реализации захватывающее антитело представляет собой антитело с HCDR, соответствующей SEQ ID NO: 10-12, и LCDR, соответствующей SEQ ID NO: 14-16. В дополнительных вариантах реализации захватывающее антитело представляет собой антитело с HCDR, соответствующей SEQ ID NO: 22-24, и LCDR, соответствующей SEQ ID NO: 26-28. В таких сэндвич-иммуноанализах также применяют детектирующее (или второе) антитело. Согласно некоторым вариантам реализации, детектирующее или второе антитело может специфично связываться с захватывающим антителом и может быть помечено обнаруживаемой меткой. В некоторых вариантах реализации детектирующее или второе антитело специфично связывает INSL5 человека или мыши, уже связанным или захваченным захватывающим или первым антителом. В некоторых таких вариантах реализации второе антитело представляет собой антитело по настоящему изобретению, которое специфично связывает INSL5 человека или мыши. В некоторых вариантах реализации второе (или детектирующее) антитело представляет собой антитело, предложенное в настоящем документе. В дополнительных вариантах реализации захватывающее (или детектирующее) антитело представляет собой антитело с HCDR, соответствующей SEQ ID NO: 10-12, и LCDR, соответствующей SEQ ID NO: 14-16. В дополнительных вариантах реализации захватывающее (или детектирующее) антитело представляет собой антитело с HCDR, соответствующей SEQ ID NO: 22-24, и LCDR, соответствующей SEQ ID NO: 26-28.

В настоящем документе термин "обнаруживаемая метка" представляет собой фрагмент, композицию или методику, которые можно применять для обнаружения образования комплекса между антителом согласно настоящему изобретению, которое специфично связывает A и B-цепи INSL5 человека или мыши. Согласно некоторым вариантам реализации обнаруживаемая метка может быть конъюгирована с антителом (либо захватывающим, либо детектирующим, в зависимости от обстоятельств) прямо или косвенно. Примеры вариантов реализации обнаруживаемых меток включают биотин; радиоизотопы; флуорофоры или другие флуоресцентные фрагменты; и ферментативные фрагменты.

Антигенсвязывающие фрагменты таких антител включают, например, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, $F(ab')_2$-фрагменты и одноцепочечные Fv-фрагменты.

"Каркасная область" или "каркасная последовательность" относится к любой из каркасных областей с 1 по 4. Гуманизированные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, охватываемые настоящим изобретением, включают молекулы, в которых любая одна или более каркасных областей 1-4 являются гуманизированными, т.е. где присутствует любая из возможных комбинаций отдельных гуманизированных областей 1-4. Например, они включают молекулы, в которых каркасная область 1 и каркасная область 2, каркасная область 1 и каркасная область 3, каркасная область 1,2 и 3 и т.д. являются гуманизированными. Гуманизированные каркасы представляют собой те, последовательность которых по меньшей мере примерно на 80% идентична известной последовательности каркаса зародышевой линии человека. Каркасные последовательности зародышевой линии человека можно получить в ImMunoGeneTics (IMGT) или из "The 20 Immunoglobulin FactsBook by Marie-Paule Lefranc and Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351." Например, каркасы легкой цепи зародышевой линии могут быть выбраны из группы, состоящей из A11, A17, A18, A19, A20, A27, A30, L1, L11, L12, L2, L5, L15, L6, L8, O12, O2 и O8, и каркасные области тяжелой цепи зародышевой линии могут быть выбраны из группы, состоящей из VH2-5, VH2-26, VH2-70, VH3-20, 25 VH3-72, VH1-46, VH3-9, VH3-66, VH3-74, VH4-31, VHI-18, VHI-69, VI-13-7, VH3-11, VH3-15, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-48, VH4-39, VH4-59 и VH5-51.

Белок "INSL5" (также известный как инсулиноподобный пептид-5) относится к гормону желудочно-кишечного тракта, кодируемому геном Insl5. INSL5 представляет собой пептид, продуцируемый энтероэндокринными клетками дистального отдела толстой кишки человека и мышей.

Результаты следующих анализов демонстрируют, что представленные в качестве примеров моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают и/или нейтрализуют INSL5 и, следовательно, могут использоваться для диагностических анализов, включая, помимо прочего, сэндвич-анализы ELISA для изучения роли INSL5 в метаболических заболеваниях, включая, помимо прочего, диабет и ожирение.

В настоящем документе раскрыты антитела для использования в диагностике, такой как диагностические анализы для обнаружения присутствия или уровня INSL5.

Примеры

Следующие неограничивающие примеры приведены в целях иллюстрации, а не ограничения.

Пример 1. Рекомбинантная экспрессия антитела I.

Антитело I представляет собой антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 7.

Антитело I получают в системе экспрессии клеток млекопитающих с использованием производных клеток CHO-K1 (Lonza Biologics Inc.). Последовательности кДНК, кодирующие SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 7, субклонируют в каркасы GS-содержащих экспрессионных плазмид (плазмиды на основе pEE12.4; Lonza Biologics Inc.). Каждая последовательность кДНК слита по рамке считывания с кодирующей последовательностью сигнального пептида, METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 29), для усиления секреции антитела в культуральную среду ткани. Экспрессия обеих последовательностей кДНК управляется вирусным промотором CMV.

Для получения антитела посредством временной трансфекции клетки CHO-K1 трансфицировали рекомбинантными экспрессионными плазмидами в равном стехиометрическом соотношении с использованием метода, основанного на PEI. Вкратце, соответствующий объем суспензии клеток CHO-K1 с плотностью 4×10^6 клеток/мл переносят во встряхиваемые колбы, и к клеткам добавляют как ПЭИ, так и рекомбинантную плазмидную ДНК. Клетки инкубируют в суспензионной культуре при 32°C в течение 6 дней. В конце периода инкубации клетки удаляют центрифугированием на низкой скорости, и антитело очищают из кондиционированной среды.

Антитело, секретированное в среду из клеток CHO-K1, очищают с помощью аффинной хроматографии с белком A с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC) и/или ионообменной хроматографией. Как правило, антитело из собранной среды захватывается на смоле Mab Select Protein A (GE). Затем смолу быстро промывают рабочим буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (ФСБ; pH 7,4), для удаления неспецифически связанного материала. Белок элюируют из смолы раствором с низким pH, таким как 10 мМ лимонная кислота pH 3. Фракции, содержащие антитело, объединяют и могут удерживаться при низком pH для инактивации потенциальных вирусов. Они могут быть нейтрализован добавлением основания, такого как 0,1М Трис pH 8,0. Антитело дополнительно очищают с помощью SEC путем загрузки концентрированного пула белка A на Superdex200 (GE Healthcare) с изократической элюцией в PBS, pH 7,4. Антитело может быть дополнительно очищено с помощью стадии ионообменной хроматографии с использованием смол, таких как Poros 50 HS (ThermoFisher). В этом случае антитело элюируют из колонки с использованием градиента NaCl от 0 до 500 мМ в 20 мМ NaOAc, pH 5,0, посредством 15-ти объемов колонки. Очищенное антитело может быть заменено буфером на PBS с pH 7,4 и сконцентрировано, например, с использованием центрифужных фильтров (таких как центробежные фильтрующие установки Amicon Ultra 50K) или тангенциально-поточной ультрафильтрацией на мембранах из регенерированной целлюлозы (Millipore).

Приведенные в данном документе антитела получают этим или подобным способом, что может быть легко определено специалистом в данной области техники.

Пример 2. Рекомбинантная экспрессия антитела II.

Антитело II представляет собой антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи: (SEQ ID NO: 17) и аминокислотную последовательность легкой цепи: (SEQ ID NO: 19).

В настоящем документе антитело SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 19 получают по существу так же, как описано для примера 1, за исключением того, что последовательности кДНК, кодирующие SEQ ID NO: 17 и 19, используют в экспрессионных плазмидах.

Функция in vitro

Пример 3. Связывание антитела с INSL5 человека и мыши посредством SPR.

Связывание in vitro антител из примеров 1 и 2 с INSL5 человека и мыши определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 25°C и при 37°C. В частности, аффинность антител из примеров 1 и 2 приведена ниже в табл. 1 и 2.

Связывание антител из примеров 1 и 2 с INSL5 человека и мыши осуществляют на приборе Biacore 8K (GE Healthcare), 1x HBS-EP+ (10 мМ HEPES pH 7,6, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% полисорбата 20) (Teknova) используют в качестве рабочего буфера. Иммобилизацию белка A (Calbiochem № 539202-5 мг) на сенсорном чипе серии S CM5 (GE Healthcare) выполняют в соответствии с инструкциями произво-

дителя (Amine Coupling Kit BR-1000-50) при 25°C. Вкратце, карбоксильные группы на поверхности сенсорного чипа (проточная кювета 1 и 2) активируют путем введения 70 мкл смеси, содержащей 75 мг/мл EDC и 11,5 мг/мл NHS, со скоростью 10 мкл/мин. Раствор 50 мкг/мл белка А готовят путем разбавления 10 мкл исходного раствора с концентрацией 5 мг/мл в 1 мл 10 мМ ацетата натрия, pH 4,5. 70 мкл этого раствора вводят на активированные поверхности чипа (проточная кювета 1 и 2, каналы с 1 по 8) со скоростью 10 мкл/мин в течение 7 мин. Избыточные реакционноспособные группы на поверхностях (проточная кювета 1 и 2) затем деактивируют путем введения 70 мкл 1 М раствора ЭТА HCl-NaOH, pH 8,5, со скоростью 10 мкл/мин. Чип кондиционируют шестью 15-секундными инъекциями 10 мМ глицин-HCl, pH 1,5 при 30 мкл/мин.

INSL5 человека (Phoenix Pharmaceuticals Cat #035-70A) и мыши INSL5 (Phoenix Pharmaceuticals 035-40) восстанавливают в концентрации 0,5 (99 мкМ) или 1 мг/мл (195 мкМ) в ДМСО соответственно. Выполняют серию двукратных разведений пептидов в 1x буфере HBS-EP+ в концентрациях 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313, 0,156 и 0 нМ. Антитела из примеров 1, 2 или отрицательный контроль получают путем разбавления их до концентрации 1 мкг/мл в 1x буфере HBS-EP+.

Эксперимент проводят при 25°C, а также при 37°C, и инициируют 5 начальными циклами введения 1x буфера HBS-EP+. Затем в каждом цикле антитело захватывается в проточной кювете 2 в каналах 1-8 со скоростью 10 мкл/мин в течение 20 с. Затем 180 мкл соответствующего образца пептида INSL5 вводят по отдельности через проточные кюветы 1 и 2 в течение 180 с при 60 мкл/мин, а затем позволяют диссоциировать в течение 1200 с при скорости потока 60 мкл/мин. Поверхность регенерируют путем введения двух 15-секундных импульсов 10 мМ глицин-HCl pH 1,5 (BR-1003-54) со скоростью 30 мкл/мин. После периода стабилизации в течение 60 с при скорости потока 60 мкл/мин начинают следующий цикл.

Полученные сенсограммы анализируют с помощью программного обеспечения Biacore 8K Evaluation Software). Подгонку модели кинетики связывания 1:1 используют для расчета кинетических параметров связывания - скорости ассоциации (ka), скорости диссоциации (kd) и равновесной константы диссоциации (K_D).

Таблица 1

Кинетика связывания антитела I и антитела II с INSL5 человека и мыши при 25°C

25°C	INSL5 человека			INSL5 мыши		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	K_D (M)	ka (1/Mc)	kd (1/c)	K_D (M)
Антитело I	8,8E+06	3,6E-04	4,1E-11	1,2E+07	5,4E-05	4,6E-12
Антитело II	1,6E+07	3,4E-04	2,1E-11	1,8E+07	1,1E-04	6,1E-12

Для антитела I, K_D при 25°C определяют как 41 пМ для INSL5 человека и 4,6 пМ для INSL5 мыши. Для антитела II, K_D при 25°C определяют как 21 пМ для INSL5 человека и 6,1 пМ для INSL5 мыши.

Таблица 2

Кинетика связывания антитела I и антитела II с INSL5 человека и мыши при 37°C

37°C	INSL5 человека			INSL5 мыши		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	K_D (M)	ka (1/Mc)	kd (1/c)	K_D (M)
Антитело I	2,4E+07	2,6E-03	1,1E-10	2,3E+07	1,5E-04	6,7E-12
Антитело II	4,0E+07	3,3E-03	8,1E-11	5,1E+07	7,2E-04	1,4E-11

Для антитела I, K_D при 37°C определяют как 110 пМ для INSL5 человека и 6,7 пМ для INSL5 мыши. Для антитела II, K_D при 37°C определяют как 81 пМ для INSL5 человека и 14 пМ для INSL5 мыши.

Пример 4. Нейтрализация активности INSL5 in vitro увеличивает продукцию цАМФ.

Нейтрализацию активности in vitro INSL5 человека и мыши с помощью антитела I и антитела II определяют с помощью динамического анализа цАМФ 2 (Cisbio Cat# 62AM4PEJ). Набор основан на технологии HTRF, которая измеряет накопление цАМФ в клетках. Клетки, стимулированные фиксированной концентрацией форсколина, увеличивают продукцию цАМФ. Введение в клетки фиксированной концентрации INSL5 человека и/или мыши ингибирует продукцию цАМФ за счет связывания с рецептором RXFP4. Антитело I и антитело II связывают и нейтрализуют действие INSL5 человека и мыши перед связыванием с рецептором RXFP4. Значения EC_{50}, полученные из данных серийных разведений антитела для антитела I и антитела II, приведены ниже в табл. 3 и демонстрируют увеличение продукции цАМФ по мере увеличения концентрации антител. Подготовка клеточных планшетов: Мышиные клетки RXFP4 CHO-K1 (DiscoveRx Part# 93-0929E2) и человеческие клетки CHO RXFP4 (DiscoveRx 93-0701E2) быстро оттаивают на водяной бане при 37°C и восстанавливают с помощью 500 мкл предварительно нагретого на водяной бане при 37°C) реагента для культивирования клеток 2 (DiscoveRx 93-0563R Series). Клетки перемешивают пипетированием вверх и вниз, а затем добавляют к 11,5 мл предварительно нагретого (на водяной бане при 37°C) реагента для культивирования клеток 2. Клетки высевают по 8000 клеток/лунку по 100 мкл на лунку в белый полноразмерный планшет (Corning-Costar 3917). Планшеты инкубируют в

течение 48 ч при 37°C, чтобы позволить клеткам прикрепиться к планшету. Через 48 ч питательную среду откачивают, и 40 мкл буфера для анализа клеток [HBSS (Hyclone SH30028.03), 20 мМ HEPES (Hyclone SH30237.01), 1% ФБС (Gibco 10438-026), 1 мМ IBMX (Sigma 15879, разбавленный в ДМСО)] добавляют в каждую лунку. В каждой лунке разводили 30 мкл буфера для анализа соединений (HBSS+20 мМ HEPES+1% ФБС), содержащего 17 мкМ форсколина (Sigma Aldrich-CAS #F3917 (10 мМ в ДМСО)).

Приготовление образцов (смеси антитело-пептид INSL5): Пептид INSL5 человека (Phoenix Pharmaceuticals, кат. #035-70) или пептид INSL5 мыши (Phoenix Pharmaceuticals, кат. #035-40) готовят при соответствующих концентрациях IC_{50} в реагенте для культивирования клеток 2. 10 мкл соответствующего пептида INSL5 (в концентрации, 16 раз превышающей конечную концентрацию в анализе, т.е. 144 нМ для INSL5 мыши и 1280 нМ для INSL5 человека) затем смешивают с 10 мкл серийного разведения антител (начиная с 160 нМ) из примеров 1 или 2 (исходная концентрация конечного антитела составляет 10 нМ). Образцы инкубируют при комнатной температуре в течение двух часов при умеренном встряхивании в планшете для ПЦР (кат. #Fisherbrand 14230244).

Проведение анализа клеток: 10 мкл смесей антитело-пептид INSL5 добавляют к 70 мкл буферной смеси в планшетах для анализа (содержащих клетки) и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч при умеренном встряхивании. Во время инкубации готовят реагенты для обнаружения цАМФ: 500 мкл исходных растворов реагентов цАМФ-d2 и Анти-цАМФ-криптата (набор cAMP dynamic 2100000 тестов, кат. #62AM4PEJ) разводят в 9,5 мл буфера для конъюгирования/лизиса каждый. После инкубации в течение 1 ч в каждую лунку планшета для анализа клеток добавляют 40 мкл реагента для обнаружения цАМФ-d2. Затем сразу же в планшет для анализа клеток добавляют 40 мкл реагента для обнаружения Анти-цАМФ-криптата. Планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч с алюминиевой крышкой. Затем пластину считывают на Perkin Elmer Envision, и результаты рассчитывают исходя из соотношения 665 нм/620 нм прибора.

Статистический анализ данных: данные импортируются из считывающего устройства Perkin Elmer Envision в программное обеспечение GraphPad Prism® (GraphPad Software, LLC; Ла-Холья, Калифорния). Получали значение EC_{50} из кривой четырехпараметрической зависимости доза-ответ с переменным коэффициентом наклона.

SEM рассчитывают путем деления стандартного отклонения EC_{50} между независимыми экспериментами (n) на квадратный корень независимых экспериментов.

Таблица 3

Нейтрализация активности INSL5 человека и мыши перед связыванием с рецептором RXFP4 с помощью антитела I и антитела II при мониторинге увеличения продукции цАМФ

Нейтрализация	INSL5 человека			INSL5 мыши		
	EC_{50} (нМ)	SEM	n	EC_{50} (нМ)	SEM	n
Антитело I	4,35	0,49	2	0,84	0,12	3
Антитело II	1,27	Н/О	1	0,45	0,01	2

Для антитела I, EC_{50} определяют как 4,35 нМ для INSL5 человека и 0,84 нМ для INSL5 мыши. Для антитела II, EC_{50} определяют как 1,27 нМ для INSL5 человека и 0,45 нМ для INSL5 мыши.

Пример 5. Термическая стабильность по TDF.

Термостабильность антитела I и антитела II определяют с помощью флуориметрии термической денатурации (TDF). В частности, температура плавления (T_m) для доменов Fc и Fab антител из примеров 1 и 2 представлена в табл. 4.

Термофлуориметрический анализ проводят на приборе для ПЦР LightCycler 480II с использованием красителя SYPRO Orange (концентрат 5000x, Invitrogen S6651). Фильтры возбуждения и эмиссии устанавливают на 465 нм и 580 нм соответственно, а температуру непрерывно повышают от 25 до 95°C со скоростью 1°C/с. Окончательные условия анализа включают примеры 1 или 2 в концентрации 0,2 мг/мл и 10x краситель SYPRO Orange в PBS, pH 7,4 (Corning 21-040-CV).

Эксперимент проводят, разбавляя образцы 1 или 2 до концентрации 0,4 мг/мл и смешивая их в равных частях с 20x красителем SYPRO Orange в PBS, pH 7,4, до достижения конечного объема 30 мкл на образец (BE05746-005). Смесь дозируют аликвотами по 6 мкл в трех экземплярах в 384-луночный планшет для анализа (Roche 04-729-749-001). Значения T_m для примеров 1 и 2 определяют с использованием программного обеспечения для анализа теплового сдвига (Roche) по методу первой производной. Программное обеспечение для анализа сглаживает необработанные данные флуоресценции, и T_m собирается путем определения температуры, при которой восходящий наклон флуоресценции в зависимости от температуры максимален (точка перегиба). Средние значения T_m и стандартное отклонение рассчитывают для каждого набора трех повторов.

Таблица 4
Термическая стабильность антитела I и антитела II по ТДФ

	Fc-домен		Fab домен	
	Температура (°C)	SD	Температура (°C)	SD
Антитело I	76,1	0,02	87,9	0,03
Антитело II	76,4	0,05	82,5	0,03

Для антитела I, T_m определяют как 76,1°C для Fc-домена и 87,9°C для Fab-домена. Для антитела II, T_m определяют как 76,4°C для Fc-домена и 82,5°C для Fab-домена.

Пример 6. Анализ обнаружения INSL5.

Антитело I и антитело II применяют для обнаружения и количественного определения концентрации INSL5 человека и мыши с помощью сэндвич-ELISA. В частности, диапазон обнаружения этого анализа составляет приблизительно от 30 пг/мл для нижнего предела обнаружения до 100000 пг/мл для верхнего предела обнаружения, как показано ниже в табл. 5.

Мечение антитела I с помощью MSD SulfoTag (сложный эфир NHS, 150 нмоль, кат. # R91AN-1): порошок MSD Sulfo-Tag ресуспендируют в оригинальном флаконе с 50 мкл ледяной воды Milli Q до концентрации 3 нмоль/мкл. Используя коэффициент мечения, равный 12, 2,7 мкл реагента добавляют к 100 мкл 1 мг/мл антитела. Раствор хорошо перемешивают, и выдерживают смесь в защищенном от света месте при встряхивании при комнатной температуре в течение 2 ч. К концу инкубации подготавливают колонку Zeba Spin Desalting (Thermo Scientific кат. #87766). Колонку переворачивают до тех пор, пока вся смола не станет гомогенной смесью. Клапан на дне колонки открывают и жидкость сливают путем центрифугирования в течение 1 мин при 1500 g. Колонку промывают три раза посредством 500 мкл 1X PBS, используя 1 мин центрифугирования 1500×g. После 2-часовой инкубации реакционный раствор для мечения антител добавляют по каплям в смолу колонки. Колонку помещают в пробирку Эппендорфа для сбора меченого антитела после 2-минутного вращения со скоростью 1500×g. Меченое антитело хранят при 4°C в темноте.

Для сэндвич-анализа ELISA, в 1 день антитело I разбавляют до 4 мкг/мл в 1x PBS (Gibco Life Technologies, кат. #14190-144). 35 мкл/лунку этого раствора наносят на планшеты MesoScale Discovery (MSD) (кат. #L15XA-3). Планшеты постукивают, чтобы равномерно покрыть лунку. Планшет герметично закрывают и инкубируют в течение ночи при комнатной температуре. На 2-й день планшеты промывали три раза, используя автоматическую машину для мытья планшетов (Biotek ELx405) с 1x PBS с 0,05% Tween 20 (20x PBS Tween20 Thermo Scientific кат. #28352). Планшеты высушивают на бумажном полотенце. В каждую лунку добавляют 100 мкл буфера Superblock (Superblock (T20) Thermo Scientific Cat #37536) и умеренно встряхивают в течение двух часов при комнатной температуре. Планшеты трижды промывают и высушивают, как описано выше. Во все лунки планшетов добавляют по 25 мкл буфера Superblock. Затем 25 мкл четырехкратных серийных разведений (выполненных в Superblock (T20)), начиная с 500 нг/мл либо INSL5 человека (Phoenix Pharmaceuticals, кат. #035-70, приготовленного в ДМСО), либо INSL5 мыши (Phoenix Pharmaceuticals, кат. #035-40). в ДМСО), добавляют в соответствующие лунки планшетов. Планшеты закрывают и умеренно встряхивают в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывают и высушивают, как описано выше. Меченное MSD Sulfotag антитело из примера 2 разводят до концентрации 1 мкг/мл (т.е. примерно в 1000 раз) в 0,2x буфере Superblock (T20) в 1x PBS/Tween 0,05%. В каждую лунку планшета добавляют по 25 мкл этого раствора и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывают и высушивают, как описано выше. 150 мкл буфера для считывания MSD 1X (буфер для считывания MSD (4X) кат. #R92TC-2) добавляют в каждую лунку и считывают на считывающем устройстве для планшетов MSD Sector. Сигнал измеряют в единицах электрохемилюминесценции (ECLU).

Статистический анализ данных: данные импортируются из считывающего устройства Mesoscale Discovery Sector в Microsoft Excel и программное обеспечение GraphPad Prism® (GraphPad Software, LLC; La Jolla, Калифорния) для определения приблизительного линейного диапазона для точного обнаружения INSL5. Диапазон обнаружения составляет приблизительно от 30 до 100000 пг/мл как для INSL5 человека, так и для INSL5 мыши.

Таблица 5

Обнаружение INSL5 мыши и человека с помощью сэндвич-ELISA с использованием антитела I для захвата и антитела II для обнаружения

	INSL5 человека		INSL5 мыши	
Разбавление №	Конц. (пг/мл)	ECLU	Конц. (пг/мл)	ECLU
1	504800	218430	511700	244857
2	126200	238191	127925	248527
3	31550	93393	31981	124617
4	7887	19907	7995	21301
5	1972	4570	1999	6823
6	493	1231	450	1902
7	123	579	125	735
8	30,8	433	31,2	491
9	7,70	413	7,81	420
10	1,93	394	1,95	552
11	0,48	771	0,49	385
Только буфер	0	306	0	382

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности

SEQ ID NO:1 – цепь A INSL5 человека

QDLQTLCCTDGCSMTDLSALC

SEQ ID NO:2 – цепь B INSL5 человека

KESVRLCGLEYIRTVIYICASSRW

SEQ ID NO:3 – цепь A INSL5 мыши

RDLQALCCREGCSMKELSTLC

SEQ ID NO:4 – цепь B INSL5 мыши

RQTVKLCGLDYVRTVIYICASSRW

SEQ ID NO:5: HC антитела I

QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSSYDMGWVRQTPGEGLEWVGTISAGGYTYYA

HWAKGRFTISKSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARERWNYDRSGGAGAGYFDLWGPG

TLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTF
PSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGG
PSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFN
STIRVVSTLPITHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREE
LSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSDGSYFLYNKLSVPTSE
WQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

SEQ ID NO:6: ДНК HC антитела I

CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACT
CACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTACGACATGGGCTGGGTCCGCCA
GACTCCAGGGGAGGGGCTGGAATGGGTCGGAACCATTAGTGCTGGTGGTTACACGT
ACTACGCGCACTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAATCCTCGACCACGGTG
GATCTGAAAATGACCAGTCTGACGACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAG
AGAAAGATGGAATTACGATAGGTCTGGTGGTGCTGGTGCTGGCTACTTTGACTTGTG
GGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTT
TCCCCTCGCACCTTGCTGTGGTGACACGCCCTCATCCACGGTAACACTGGGCTGTCT
TGTCAAAGGATACCTTCCGGAGCCAGTCACAGTAACGTGGAACTCGGGAACATTGA
CAAACGGCGTAAGAACGTTTCCGTCGGTACGTCAAAGTTCAGGCCTCTACTCGCTCA
GCTCCGTAGTATCGGTGACCTCATCCAGCCAGCCGGTGACTTGCAACGTGGCGCATC
CCGCGACCAACACAAAAGTGGATAAGACCGTTGCACCCTCAACTTGCTCCAAGCCC
ACGTGTCCCCCACCAGAGCTGCTCGGTGGGCCCTCGGTCTTTATCTTCCCTCCGAAA
CCCAAAGACACATTGATGATCTCTCGCACGCCGGAAGTCACGTGCGTGGTCGTGGA
CGTCAGCCAAGATGACCCGGAAGTGCAATTCACCTGGTATATCAATAACGAACAGG
TCAGAACGGCTCGGCCTCCTTTGCGAGAACAACAGTTCAATTCCACTATCAGGGTTG
TATCAACACTTCCCATCACACACCAAGATTGGCTTAGGGGAAAGGAGTTTAAGTGTA
AAGTGCACAATAAGGCTTTGCCAGCGCCTATTGAGAAAACCATTTCCAAAGCCCGT
GGGCAACCGCTTGAACCCAAAGTCTATACAATGGGGCCACCCAGAGAGGAACTGTC
GAGCCGCTCCGTGTCACTGACTTGTATGATCAATGGGTTCTATCCGTCGGACATTTC
GGTGGAATGGGAGAAGAATGGAAAAGCAGAGGATAACTACAAAACTACGCCAGCC
GTGTTGGACTCTGACGGGTCATACTTTCTGTACAATAAGCTCTCTGTCCCCACGTCG
GAATGGCAGAGGGGAGATGTGTTTACTTGCTCGGTGATGCATGAGGCGCTCCATAA
TCACTATACCCAGAAAAGCATCAGTCGAAGCCCTGGGAAA

SEQ ID NO:7: LC антитела I

ADVVMTQTASPVSAAVGGTVTINCQASQSITSSYLSWYQQKPGQPPKLLIYPAANLASG
VPSRFKGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLYGYFSSSIDFAFGGGTEVVVRGDPVAPT
VLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYN
LSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

SEQ ID NO:8: ДНК LC антитела I
GCCGATGTCGTGATGACCCAGACTGCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACA
GTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTACTAGTAGCTACTTATCCTGGTAT
CAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATCCTGCAGCCAATCTGGC
ATCTGGAGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCAC
CATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTATACGGTTATTT
TAGTTCTAGTATTGATTTTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAGAGGTGA
TCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAAGTCGCAACAGG
TACTGTGACGATCGTGTGTGTCGCGAACAAATACTTTCCCGACGTGACCGTGACGTG
GGAAGTCGACGGAACAACCCAGACGACCGGGATCGAAAACTCAAAGACCCCGCAA
AACTCGGCCGATTGCACATACAATTTGTCCTCTACGCTTACACTCACGTCGACGCAG
TACAATAGTCACAAGGAGTATACATGCAAAGTTACTCAAGGAACTACGAGCGTGGT
CCAGTCATTCAATAGAGGGGATTGT

SEQ ID NO:9: VH антитела I
QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSSYDMGWVRQTPGEGLEWVGTISAGGYTYYA
HWAKGRFTISKSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARERWNYDRSGGAGAGYFDLWGPG
TLVTVSS

SEQ ID NO:10: HCDR1 антитела I
TASGFSLSSYDMG

SEQ ID NO:11: HCDR2 антитела I
TISAGGYTY

SEQ ID NO:12: HCDR3 антитела I
ARERWNYDRSGGAGAGYFDL

SEQ ID NO:13: VL антитела I

ADVVMTQTASPVSAAVGGTVTINCQASQSITSSYLSWYQQKPGQPPKLLIYPAANLASG
VPSRFKGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLYGYFSSSIDFAFGGGTEVVVR

SEQ ID NO:14: LCDR1 антитела I
QASQSITSSYLS

SEQ ID NO:15: LCDR2 антитела I
YPAANLAS

SEQ ID NO:16: LCDR3 антитела I
LYGYFSSSIDFA

SEQ ID NO:17: HC антитела II
QSVEESGGGLVTPGGSLTLTCTVSGIDLTTYAMGWVRQAPGEGLEWIGIIGGGGRTYYA
AWAKGRFTISKTSTTVDLRITSPATEDTATYFCVRGGDFFDLWGPGTLVTVSSGQPKAPS
VFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSS
VVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPITHQ
DWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMING
FYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSDGSYFLYNKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMH
EALHNHYTQKSISRSPGK

SEQ ID NO:18: ДНК HC антитела II
CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTAACGCCTGGAGGATCCCTGACACT
CACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTCACTACCTATGCAATGGGCTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAATGGATCGGAATTATTGGTGGTGGTGGTCGAACAT
ACTACGCGGCCTGGGCGAAAGGCCGCTTCACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTG
GATCTGAGAATCACCAGTCCGGCAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGTCAG
AGGAGGAGACTTCTTTGACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGG
GCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTTCCCCTCGCACCTTGCTGTGGTGACACGCCCTC
ATCCACGGTAACACTGGGCTGTCTTGTCAAAGGATACCTTCCGGAGCCAGTCACAGT
AACGTGGAACTCGGGAACATTGACAAACGGCGTAAGAACGTTTCCGTCGGTACGTC
AAAGTTCAGGCCTCTACTCGCTCAGCTCCGTAGTATCGGTGACCTCATCCAGCCAGC
CGGTGACTTGCAACGTGGCGCATCCCGCGACCAACACAAAAGTGGATAAGACCGTT
GCACCCTCAACTTGCTCCAAGCCCACGTGTCCCCCACCAGAGCTGCTCGGTGGGCCC

TCGGTCTTTATCTTCCCTCCGAAACCCAAAGACACATTGATGATCTCTCGCACGCCG
GAAGTCACGTGCGTGGTCGTGGACGTCAGCCAAGATGACCCGGAAGTGCAATTCAC
CTGGTATATCAATAACGAACAGGTCAGAACGGCTCGGCCTCCTTTGCGAGAACAAC
AGTTCAATTCCACTATCAGGGTTGTATCAACACTTCCCATCACACACCAAGATTGGC
TTAGGGGAAAGGAGTTTAAGTGTAAAGTGCACAATAAGGCTTTGCCAGCGCCTATT
GAGAAAACCATTTCCAAAGCCCGTGGGCAACCGCTTGAACCCAAAGTCTATACAAT
GGGGCCACCCAGAGAGGAACTGTCGAGCCGCTCCGTGTCACTGACTTGTATGATCA
ATGGGTTCTATCCGTCGGACATTTCGGTGGAATGGGAGAAGAATGGAAAAGCAGAG
GATAACTACAAAACTACGCCAGCCGTGTTGGACTCTGACGGGTCATACTTTCTGTAC
AATAAGCTCTCTGTCCCCACGTCGGAATGGCAGAGGGGAGATGTGTTTACTTGCTCG
GTGATGCATGAGGCGCTCCATAATCACTATACCCAGAAAAGCATCAGTCGAAGCCC
TGGGAAA

SEQ ID NO:19: LC антитела II

AQVLTQTPASVSAAVGGTVTIKCQASEDISKYLSWYQQKPGQRPKLLIYYVSNLEFGVP
SRFKGSGSGTEYTLTISDLECDDAATYYCHQGYTGVNVENVFGGGTEVVVRGDPVAPT
VLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYN
LSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

SEQ ID NO:20: ДНК LC антитела II

GCTCAAGTGCTGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTC
ACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGGATATTAGCAAGTACTTATCCTGGTATCAGCA
GAAACCAGGGCAGCGCCCCAAACTCCTGATCTATTATGTATCCAATCTGGAATTTGG
GGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACACTCTCACCATCA
GCGACCTGGAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCACCAGGGTTATACCGGTG
TTAATGTTGAAAATGTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAGAGGTGATCCA
GTTGCACCTACTGTCCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAAGTCGCAACAGGTACT
GTGACGATCGTGTGTGTCGCGAACAAATACTTTCCCGACGTGACCGTGACGTGGGA
AGTCGACGGAACAACCCAGACGACCGGGATCGAAAACTCAAAGACCCCGCAAAAC
TCGGCCGATTGCACATACAATTTGTCCTCTACGCTTACACTCACGTCGACGCAGTAC
AATAGTCACAAGGAGTATACATGCAAAGTTACTCAAGGAACTACGAGCGTGGTCCA
GTCATTCAATAGAGGGGATTGT

SEQ ID NO:21: VH антитела II

QSVEESGGGLVTPGGSLTLTCTVSGIDLTTYAMGWVRQAPGEGLEWIGIIGGGGRTYYA
AWAKGRFTISKTSTTVDLRITSPATEDTATYFCVRGGDFFDLWGPGTLVTVSS

SEQ ID NO:22: HCDR1 антитела II
TVSGIDLTTYAMG

SEQ ID NO:23: HCDR2 антитела II
IIGGGGRTY

SEQ ID NO:24: HCDR3 антитела II
VRGGDFFDL

SEQ ID NO:25: VL антитела II
AQVLTQTPASVSAAVGGTVTIKCQASEDISKYLSWYQQKPGQRPKLLIYYVSNLEFGVP
SRFKGSGSGTEYTLTISDLECDDAATYYCHQGYTGVNVENVFGGGTEVVVR

SEQ ID NO:26 LCDR1 антитела II
QASEDISKYLS

SEQ ID NO:27 LCDR2 антитела II
YYVSNLEF

SEQ ID NO:28 LCDR3 антитела II
HQGYTGVNVENV

SEQ ID NO:29 Сигнальный пептид
METDTLLLWVLLLWVPGSTG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает INSL5, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит области, определяющие комплементарность тяжелой цепи (HCDR) - HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и указанная VL содержит области, определяющие комплементарность легкой цепи (LCDR) - LCDR1, LCDR2 и LCDR3, при этом:
HCDR1 содержит TASGFSLSSYDMG (SEQ ID NO: 10);
HCDR2 содержит TISAGGYTY (SEQ ID NO: 11);
HCDR3 содержит ARERWNYDRSGGAGAGYFDL (SEQ ID NO: 12);
LCDR1 содержит QASQSITSSYLS (SEQ ID NO: 14);
LCDR2 содержит YPAANLAS (SEQ ID NO: 15); и
LCDR3 содержит LYGYFSSSIDFA (SEQ ID NO: 16).

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что указанная VH содержит SEQ ID NO: 9 и указанная VL содержит SEQ ID NO: 13.

3. Антитело по п.1 или 2, отличающееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 5, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 7.

4. Антитело по п.1 или 2, отличающееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислоты 2-446 SEQ ID NO: 5, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 7.

5. Антитело по п.1 или 2, отличающееся тем, что указанное антитело содержит HC, состоящую из SEQ ID NO: 5, и LC, состоящую из SEQ ID NO: 7.

6. Антитело по любому из пп.1-5, которое связывает INSL5 человека.

7. Антитело по любому из пп.1-5, которое связывает INSL5 мыши.

8. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 5 или SEQ ID

NO: 7.

9. Композиция для связывания INSL5, содержащая первый вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 5, и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 7.

10. Клетка, содержащая:

(a) первый вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 5, и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 7; или

(b) вектор, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 5, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 7.

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2