

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490902 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.08.13

(22) Дата подачи заявки
2022.10.27

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) НОВЫЕ АНТИТЕЛА К IL-36R

(31) PCT/CN2021/127544;
PCT/CN2022/118446

(32) 2021.10.29; 2022.09.13

(33) CN

(86) PCT/CN2022/127898

(87) WO 2023/072182 2023.05.04

(71) Заявитель:
ИНМАДЖИН ПТИ. ЛТД. (SG)

(72) Изобретатель:
Фань Пэнчэн, Лэй Жунь, Го Чунтянь,
Фань Лихуа, Сунь Цян, Сюй Чжихао
(CN)

(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Предложены антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, выделенные полинуклеотиды, их кодирующие, фармацевтические композиции, их содержащие, и их применение.

A1

202490902

202490902

A1

PCT/CN2022/127898

МПК: C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)
C12N 5/10 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

НОВЫЕ АНТИТЕЛА К ИЛ-36R

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в общем относится к новым антителам к ИЛ-36R.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Рецептор интерлейкина 36 (ИЛ-36R) экспрессируется на клеточной поверхности и принадлежит к семейству ИЛ1R. Существует три агониста ИЛ-36R (а именно, ИЛ-36 α , ИЛ-36 β и ИЛ-36 γ) и два антагониста (а именно, ИЛ-36Ra (*IL36RN*) и ИЛ-38). Лиганды ИЛ-36R в основном происходят из кератиноцитов, эпителиальных клеток, Т-/В-лимфоцитов, моноцитов, дендритных клеток, макрофагов и т.д. ИЛ-36R обычно экспрессируется на кератиноцитах, фибробластах, дендритных клетках, эндотелиальных клетках, моноцитах, макрофагах, клетках Лангерганса, CD4+ Т-клетках и т.д. и функционирует посредством передачи сигнала через путь NF κ B или MARK. Ключевыми функциями ИЛ-36R в клетке являются индукция провоспалительных цитокинов и хемокинов и усиление активации и пролиферации клеток.

Однако, в связи с ассоциированными с ИЛ-36R дерматологическими заболеваниями имеются неудовлетворенные в высокой степени медицинские потребности. Поэтому сохраняются потребности в новых антителах к ИЛ-36R.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

По всему тексту настоящего описания единственное число означает один или более чем один (т.е. по меньшей мере один) объект. В качестве примера, «антитело» означает одно антитело или более одного антитела.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, способным специфически связываться с человеческим ИЛ-36R, которые содержат определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность DYYX₁X₂ (SEQ ID NO: 191), SEQ ID NO: 19, 33, 48, 64, 79, 94, 109, 124 или 139; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность LIRNKAAGYTIYYX₃X₄X₅VKG (SEQ ID NO: 192), SEQ ID NO: 20, 34, 49, 65, 80, 95, 110, 125 или 140; и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 21, 35, 50, 66, 81, 96, 111, 126 или 141; где X₁ представляет собой M или L; X₂ представляет собой N, H, S или R; X₃ представляет собой S или A; X₄ представляет собой A или D; X₅ представляет собой S или P.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASX₁₈NINIWLS (SEQ ID NO: 193), SEQ ID NO: 22, 36, 51, 67, 82, 97, 112, 127 или 142; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 23, 37, 52, 68, 83, 98, 113, 128 или 113; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность X₁₉QSQSYPLT (SEQ ID NO: 194), SEQ ID NO: 24, 38, 53, 69, 84, 99, 114, 129 или 143; где X₁₈ представляет собой Q или R; X₁₉ представляет собой Q или L.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где (a) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность DYYX₁X₂ (SEQ ID NO: 191), HCDR2 содержит аминокислотную последовательность LIRNKAAGYTIYYX₃X₄X₅VKG (SEQ ID NO: 192), HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASX₁₈NINIWLS (SEQ ID NO: 193), LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность X₁₉QSQSYPLT (SEQ ID NO: 194), где X₁ представляет собой M или L; X₂ представляет собой N, H, S или R; X₃ представляет собой S или A; X₄ представляет собой A или D; X₅ представляет собой S или P; X₁₈ представляет собой Q или R; X₁₉ представляет собой Q или L; (b) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; (c) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; (d) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, HCDR3 содержит аминокислотную

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, дополнительно содержат одну или более каркасных областей тяжелой цепи 1 (HFR1), HFR2, HFR3 и HFR4 и/или одну или более каркасных областей легкой цепи 1 (LFR1), LFR2, LFR3 и LFR4, где HFR1 содержит аминокислотную последовательность $X_6VQLX_7ESGGGLVKPGGSLRLSCAASGX_8X_9FX_{10}$ (SEQ ID NO: 195) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, HFR2 содержит аминокислотную последовательность $WX_{11}RQAPGKGLEWVX_{12}$ (SEQ ID NO: 196) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, HFR3 содержит аминокислотную последовательность $RFTISRDX_{13}X_{14}KSX_{15}LYLQMNSLX_{16}X_{17}EDTAVYYCVR$ (SEQ ID NO: 197) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, HFR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157 или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, LFR1 содержит аминокислотную последовательность $X_{20}IVMTQSPX_{21}X_{22}X_{23}SX_{24}SX_{25}GX_{26}RX_{27}TX_{28}X_{29}C$ (SEQ ID NO: 198) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, LFR2 содержит аминокислотную последовательность $WYQQKPGX_{30}APX_{31}LFIY$ (SEQ ID NO: 199) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, LFR3 содержит аминокислотную последовательность $GVPX_{32}RFSGSGSGTX_{33}FTLTISLQX_{34}EDFAX_{35}YYC$ (SEQ ID NO: 200) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, LFR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161 или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, где X_6 представляет собой Q или E; X_7 представляет собой Q или V; X_8 представляет собой F или Y; X_9 представляет собой A, D или N; X_{10} представляет собой T или G; X_{11} представляет собой I или V; X_{12} представляет собой S или A; X_{13} представляет собой N или D; X_{14} представляет собой A или S; X_{15} представляет собой S или T; X_{16} представляет собой R или K; X_{17} представляет собой A или T; X_{20} представляет собой D или E; X_{21} представляет собой S или A; X_{22} представляет собой S или T; X_{23} представляет собой L или V; X_{24} представляет собой A или V; X_{25} представляет собой V или P; X_{26} представляет собой D или E; X_{27} представляет собой V или A; X_{28} представляет собой I или L; X_{29} представляет собой T или S; X_{30} представляет собой Q или K; X_{31} представляет собой K или R; X_{32} представляет собой S или A; X_{33} представляет собой D или E; X_{34} представляет собой S или P; X_{35} представляет собой T или V.

В некоторых воплощениях HFR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 25, 39, 54, 70, 85, 100, 115, 130, 144, 154, 165, 174, 178, 181, 186, 190 и 195, HFR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 40, 55, 71, 86, 101, 116, 131, 145, 155, 166, 175 и 196, HFR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 27, 41, 56, 72, 87, 56, 117, 132, 146, 156, 167, 167, 156, 156, 156, 156, 156, 156, 156 и 197, HFR4 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 42, 57, 73, 102, 118 и 157, LFR1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 28, 43, 58, 74, 88, 103, 119, 133, 147, 158, 168 и 198, LFR2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 29, 44, 59, 75, 89, 104, 120, 134, 159, 169 и 199, LFR3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 30, 45, 60, 76, 90, 105, 121, 135, 148, 160, 170 и 200, и LFR4 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 61, 91, 106, 136, 161.

В некоторых воплощениях переменная область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем изобретении, содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 17, 31, 46, 62, 77, 92, 107, 122, 137, 149, 162, 171, 176, 179, 182, 183, 185, 187 и 189 и гомологичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательности при сохранении аффинности специфического связывания с человеческим IL-36R.

В некоторых воплощениях переменная область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем изобретении, содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 32, 47, 63, 78, 93, 108, 123, 138, 150, 163, 172 и 177 и гомологичной им последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательности при сохранении аффинности специфического связывания с человеческим IL-36R.

В некоторых воплощениях в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, предложенных в настоящем изобретении, переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 1, и переменная область легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 2; или переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 17, и переменная область легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 18; или переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 31, и переменная область легкой цепи содержит

последовательность SEQ ID NO: 189, и варибельная область легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 150.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, дополнительно содержат одну или более замен или модификаций аминокислотных остатков при сохранении аффинности специфического связывания с человеческим IL-36R. В некоторых воплощениях по меньшей мере одна из указанных замен или модификаций находится в одной или более из последовательностей CDR и/или в одной или более последовательностей, отличных от CDR, варибельной области тяжелой цепи или варибельной области легкой цепи. В некоторых воплощениях по меньшей мере одна из указанных замен представляет собой консервативную замену.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, дополнительно содержат область Fc, возможно область Fc человеческого иммуноглобулина (Ig) или возможно область Fc человеческого IgG. В некоторых воплощениях область Fc происходит из человеческих IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 или IgM. В некоторых воплощениях область Fc, происходящая из человеческого IgG4, содержит мутации M252Y/S254T/T256E (YTE). В некоторых воплощениях область Fc, происходящая из человеческого IgG4, содержит мутации T307Q/N434A (QA).

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, являются гуманизированными. В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой моноклональное антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, рекомбинантное антитело, химерное антитело, меченое антитело, бивалентное антитело, антиидиотипическое антитело или слитый белок.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой диатело, фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, стабилизированный дисульфидной связью фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидной связью диатело (ds-диатело), молекулу одноцепочечного антитела (scFv), димер scFv (бивалентное диатело), мультиспецифическое антитело, камелизированное однодоменное антитело, наноантитело, доменное антитело или бивалентное доменное антитело.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, обладают одним или более связывающими свойствами в отношении человеческого IL-36R, выбранными из группы, состоящей из: а)

наличия аффинности связывания с человеческим IL-36R с K_d не более 2×10^{-8} M (предпочтительно не более 1×10^{-8} M, например, не более 9×10^{-9} M, 8×10^{-9} M, 7×10^{-9} M, 6×10^{-9} M, 5×10^{-9} M, 4×10^{-9} M, 3×10^{-9} M, 2×10^{-9} M или 1×10^{-10} M) по результатам измерения методом биослойной интерферометрии (BLI), b) наличия аффинности связывания с человеческим IL-36R с K_d не более 1×10^{-8} M (например не более 9×10^{-9} M, 8×10^{-9} M, 7×10^{-9} M, 6×10^{-9} M, 5×10^{-9} M, 4×10^{-9} M, 3×10^{-9} M, 2×10^{-9} M или 1×10^{-10} M) по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и c) специфического связывания с человеческим IL-36R с EC_{50} не более 0,1 мкг/мл (например 0,09 мкг/мл, 0,08 мкг/мл, 0,07 мкг/мл, 0,06 мкг/мл, 0,05 мкг/мл, 0,04 мкг/мл, 0,03 мкг/мл, 0,02 мкг/мл, 0,01 мкг/мл или 0,005 мкг/мл) по результатам измерения методом твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA); и d) наличия аффинности связывания с мембранным человеческим IL-36R с EC_{50} не более 0,5 мкг/мл (например 0,4 мкг/мл, 0,3 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,19 мкг/мл, 0,18 мкг/мл, 0,17 мкг/мл, 0,16 мкг/мл, 0,15 мкг/мл или 0,1 мкг/мл) по результатам измерения методом флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS).

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, способны блокировать передачу сигнала через IL-36R, индуцированную агонистом IL-36R (предпочтительно IL-36 α), по результатам измерения методом репортерного анализа IL-36R.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из: a) способности ингибировать индуцированное агонистом IL-36R высвобождение IL-8 в клетке, b) наличия способности ингибировать индуцированное агонистом IL-36R высвобождение IL-6 в клетке и d) наличия способности ингибировать индуцированное агонистом IL-36R высвобождение TNF α в клетке; где агонист IL-36R включает IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ .

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к антителу к IL-36R или его антигенсвязывающему фрагменту, которые не конкурируют за связывание человеческого IL-36R с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, известными специалистам в данной области техники. В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не конкурируют за связывание человеческого IL-36R с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 205, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 206. В некоторых воплощениях антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент не конкурируют за связывание человеческого IL-36R с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 209, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 210.

В некоторых воплощениях антитело к IL-36R или его антигенсвязывающий фрагмент в настоящем изобретении связываются с человеческим IL-36R с высокой специфичностью. В некоторых воплощениях предложенные антитело к IL-36R или его антигенсвязывающий фрагмент не связываются с IL-36R яванского макака или мышинным IL-36R. В некоторых воплощениях предложенные антитело к IL-36R или его антигенсвязывающий фрагмент не связываются с человеческим IL-1R1.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, являются биспецифическими. В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, способны специфически связываться со вторым антигеном, отличным от IL-36R, или вторым эпитопом на IL-36R. В некоторых воплощениях второй антиген, отличный от IL-36R, выбран из группы состоящей из IL-17, IL-23, TNF, IL-12 и IL-1.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к конъюгату антитела с лекарственным средством, содержащему антитело к IL-36R или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, связанные с одним или более конъюгированными группировками. В некоторых воплощениях конъюгированная группировка может включать детектируемый маркер, лекарственное средство, токсин, цитокин, радионуклид, фермент или любые их комбинации.

В некоторых воплощениях конъюгированная группировка включает модифицирующий элиминацию агент, химиотерапевтический агент, токсин, радиоактивный изотоп, лантаноид, люминесцентную метку, флуоресцентную метку, фермент-субстратную метку, агент, алкилирующий ДНК, ингибитор топоизомеразы, агент, связывающийся с тубулином, или другие противораковые лекарственные средства.

В некоторых воплощениях конъюгированная группировка включает лекарственное средство или терапевтический агент.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен TCR, где антигенсвязывающий домен специфически связывается с IL-36R и содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела к

IL-36R, предложенного в настоящем изобретении. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит костимулирующий домен. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен в CAR специфически связывается с человеческим IL-36R и содержит антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен в CAR специфически связывается с человеческим IL-36R и содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, предложенные в настоящем изобретении, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, предложенные в настоящем изобретении. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен в CAR содержит HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность $DYYX_1X_2$ (SEQ ID NO: 191), SEQ ID NO: 19, 33, 48, 64, 79, 94, 109, 124 или 139; HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность $LIRNKAAGYTIYYX_3X_4X_5VKG$ (SEQ ID NO: 192), SEQ ID NO: 20, 34, 49, 65, 80, 95, 110, 125 или 140; и HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 21, 35, 50, 66, 81, 96, 111, 126 или 141; где X_1 представляет собой M или L; X_2 представляет собой N, H, S или R; X_3 представляет собой S или A; X_4 представляет собой A или D; X_5 представляет собой S или P, и/или LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность $RASX_{18}NINIWLS$ (SEQ ID NO: 193), SEQ ID NO: 22, 36, 51, 67, 82, 97, 112, 127 или 142; LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 23, 37, 52, 68, 83, 98, 113, 128 или 113; и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность $X_{19}QSQSYPLT$ (SEQ ID NO: 194), SEQ ID NO: 24, 38, 53, 69, 84, 99, 114, 129 или 143; где X_{18} представляет собой Q или R; X_{19} представляет собой Q или L. В некоторых воплощениях HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 180, 184 или 188, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 151, 164 или 173, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или 152, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или 153.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен в CAR специфически связывается с человеческим IL-36R и содержит пару VH/VL, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/2, 17/18, 31/32, 46/47, 62/63, 77/78, 92/93, 107/108, 122/123 и 137/138. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен в CAR специфически

связывается с человеческим IL-36R и содержит пару VH/VL, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 162/163, 171/172, 176/177, 179/150, 182/150, 149/150, 183/150, 185/150, 187/150 и 189/150.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR) по настоящему изобретению. В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к клетке, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к клетке, генетически модифицированной для экспрессии CAR по настоящему изобретению. В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к способу стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа на экспрессирующие IL-36R клетки или ткани в организме млекопитающего, включающему введение указанному млекопитающему эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии CAR по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения млекопитающего, имеющего ассоциированное с IL-36R заболевание или состояние, включающему введение указанному млекопитающему эффективного количества клетки по настоящему изобретению, посредством чего осуществляется лечение указанного млекопитающего. В некоторых воплощениях указанная клетка представляет собой аутологичную Т-клетку. В некоторых воплощениях указанное млекопитающее представляет собой субъекта-человека. В некоторых воплощениях указанное млекопитающее идентифицировано как имеющее IL-36R-положительную клетку или клетку с нарушением регуляции передачи сигнала через IL-36R.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полинуклеотид, кодирующий указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела с лекарственным средством, CAR или рекомбинантную иммунную клетку по настоящему изобретению и один или более фармацевтически приемлемых носителей.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к вектору, содержащему выделенный полинуклеотид по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к набору, содержащему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и второй терапевтический агент.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к способу экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, при которых экспрессируется вектор по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения, предупреждения или ослабления заболеваний или расстройств, реагирующих на ингибирование IL-36R, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полинуклеотида, кодирующего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгата антитела с лекарственным средством, рекомбинантной иммунной клетки и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В некоторых воплощениях указанное заболевание или расстройство ассоциировано с нарушением регуляции IL-36R-опосредованной передачи сигнала. В некоторых воплощениях нарушение регуляции IL-36R-опосредованной передачи сигнала включает нарушение регуляции IL-36 (например IL-36 α , IL-36 β или IL-36 γ), антагониста IL-36R и/или IL-38. В некоторых воплощениях нарушение регуляции IL-36R-опосредованной передачи сигнала включает избыточную активацию IL-36 (например IL-36 α , IL-36 β или IL-36 γ), или избыточное подавление антагониста IL-36R, или избыточное подавление IL-38 по сравнению с контрольным уровнем (например уровнем у здорового субъекта).

В некоторых воплощениях заболевание или расстройство представляет собой воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание, респираторное заболевание, болезнь обмена веществ или рак.

В некоторых воплощениях воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из: аллергического воспаления кожи, легких и желудочно-кишечного тракта,

атопического дерматита (также известного как атопическая экзема), астмы (аллергической и неаллергической), опосредованного эпителием воспаления, фиброза (например, идиопатического легочного фиброза, склеродермии, фиброза почек и рубцевания), аллергического ринита, видов пищевой аллергии (например, аллергии на арахис, яйца, молочные продукты, морепродукты, лесные орехи и т. д.), видов сезонной аллергии и других видов аллергии. В некоторых воплощениях воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из аллергического воспаления кожи, легких и желудочно-кишечного тракта, атопического дерматита (также известного как атопическая экзема), астмы (аллергической и неаллергической) и опосредованного эпителием воспаления.

В некоторых воплощениях аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из: рассеянного склероза, астмы, сахарного диабета 1-го типа, ревматоидного артрита, склеродермии, болезни Крона, псориаза обыкновенного (часто называемого псориазом), гнойного гидраденита, генерализованного пустулезного псориаза (ГПП), ладонно-подошвенного пустулеза (ЛПП), воспалительного заболевания кишечника, псориазического артрита, системной красной волчанки (СКВ), язвенного колита, анкилозирующего спондилита, атопического дерматита и угрей обыкновенных. В некоторых воплощениях указанный способ полезен для лечения пустулезного псориаза, генерализованного пустулезного псориаза, ладонно-подошвенного пустулеза (ЛПП), псориаза обыкновенного, атопического дерматита и угрей обыкновенных. В некоторых воплощениях аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из псориаза обыкновенного (часто называемого псориазом), гнойного гидраденита, генерализованного пустулезного псориаза (ГПП), ладонно-подошвенного пустулеза (ЛПП), воспалительного заболевания кишечника, атопического дерматита, угрей обыкновенных и болезни Бехчета (также называемой синдромом Бехчета).

В некоторых воплощениях респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, муковисцидоза, эмфиземы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и острого респираторного дистресс-синдрома.

В некоторых воплощениях болезнь обмена веществ выбрана из группы, состоящей из ожирения, диабета 2-го типа, атеросклероза и сердечно-сосудистого заболевания.

В некоторых воплощениях рак может представлять собой любой тип рака, известный в данной области, включая без ограничения меланому, почечно-клеточную карциному, рак легких, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак гортани, рак печени, рак щитовидной железы, рак желудка, рак

слюнной железы, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, лейкоз, лимфому и карциному из клеток Меркеля.

В некоторых воплощениях заболевание или расстройство выбраны из группы, состоящей из псориаза, пустулезного псориаза, гнойного гидраденита, ихтиоза, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), атопического дерматита, угрей обыкновенных и болезни Бехчета.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к способу модулирования активности IL-36R в IL-36R-положительной клетке, включающему воздействие на IL-36R-положительную клетку антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению и/или фармацевтической композицией по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к способу определения присутствия или количества IL-36R в образце, включающему приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению и определение присутствия или количества IL-36R в указанном образце.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к способу диагностики ассоциированного с IL-36R заболевания, расстройства или состояния у субъекта, включающему: а) приведение образца, полученного от субъекта, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению и/или фармацевтической композицией по настоящему изобретению; б) определение присутствия или количества IL-36R в образце; и с) установление корреляции между присутствием или количеством IL-36R и наличием или статусом ассоциированного с IL-36R заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 151, HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 152, LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 153.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения, предупреждения или ослабления заболеваний или расстройств, реагирующих на ингибирование IL-36R, у субъекта.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в изготовлении диагностического реагента для диагностики заболеваний или расстройств, реагирующих на ингибирование IL-36R, у субъекта. В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к набору, содержащему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, полезные для обнаружения IL-36R. В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 151, HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 152, LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 153.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 показан анализ аффинности связывания антител к IL-36R.

На Фиг. 2 показана блокирование антителами передачи сигнала через IL-36R (репортерный анализ IL-36R).

На Фиг. 3 показана блокирующая активность гуманизованного антитела к IL-36R 5F7.

На Фиг. 4 показана блокирующая активность 5F7 после созревания аффинности.

На Фиг. 5 показана кривая кинетики связывания антител с hIL-36R (по данным SPR).

На Фиг. 6 показан анализ связывания 5F7-2a8 с hIL-36R-his методом ELISA.

На Фиг. 7 показано связывание антител с мембранным hIL-36R.

На Фиг. 8 показано связывание антител с мембранным IL-36R яванского макака.

На Фиг. 9 показано связывание антител с мембранным мышинным IL-36R.

На Фиг. 10 показан анализ связывания с hIL1R1.

На Фиг. 11 показано, что 5F7-2a8 блокирует индуцированное IL-36 α / β / γ высвобождение IL-8 в клетках A431.

На Фиг. 12 показано, что 5F7-2a8 блокирует индуцированное IL-36 α высвобождение IL-8 в клетках HDF.

На Фиг. 13 показано, что 5F7-2a8 блокирует индуцированное IL-36 α высвобождение IL-8/IL-6/TNF α в клетках HEK.

На Фиг. 14 показано, что 5F7-2a8 блокирует индуцированное IL-36 β высвобождение IL-8/IL-6/TNF α в клетках НЕК.

На Фиг. 15 показано, что 5F7-2a8 блокирует индуцированное IL-36 γ высвобождение IL-8/IL-6/TNF α в клетках НЕК.

На Фиг. 16 показана аффинностью связывания антител с hFcRn.

На Фиг. 17 показаны результаты фармакокинетического исследования вариантов Fc антитела 5F7-2a8 у яванского макака.

На Фиг. 18 показана блокирующая активность антител к IL-36R, определенная с помощью репортерного анализа IL-36R.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следующее далее описание изобретения предназначено только для иллюстрации различных воплощений изобретения. По существу, обсуждаемые специфические модификации не следует трактовать как ограничения объема изобретения. Специалисту в данной области техники будет понятно, что могут быть предложены различные эквиваленты, изменения и модификации без отступления от объема изобретения, и при этом понимается, что такие эквивалентные воплощения также включены в настоящее изобретение. Все цитируемые в настоящем изобретении ссылки, в том числе публикации, патенты и заявки на патенты, включены в данное описание путем ссылки в полном объеме.

Определения

Термин «антитело» при использовании в настоящем изобретении включает любые иммуноглобулин, моноклональное антитело, поликлональное антитело, мультивалентное антитело, бивалентное антитело, моновалентное антитело, мультиспецифическое антитело или биспецифическое антитело, которые связываются со специфическим антигеном. Нативное интактное антитело содержит две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи. Тяжелые цепи млекопитающих классифицируют как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, при этом каждая тяжелая цепь состоит из переменной области (VH) и первой, второй, третьей и возможно четвертой константной области (CH1, CH2, CH3, CH4, соответственно); легкие цепи млекопитающих классифицируют как λ или κ , при этом каждая легкая цепь состоит из переменной области (VL) и константной области. Антитело имеет форму буквы «Y», при этом стебель Y состоит из вторых и третьих константных областей двух тяжелых цепей, связанных вместе посредством дисульфидных связей. Каждое плечо Y содержит переменную область и первую константную область одной тяжелой цепи, связанные с переменной и константной областями одной легкой цепи. Переменные области легкой и тяжелой цепей отвечают за связывание антигена.

Вариабельные области обеих цепей в общем случае содержат три высоковариабельные петли, называемые определяющими комплементарность областями (CDR) (CDR легкой цепи включают LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и CDR тяжелой цепи включают HCDR1, HCDR2, HCDR3). Границы CDR для антител и антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем изобретении, могут быть охарактеризованы или определены в соответствии со стандартной нумерацией по Кабату, IMGT, Хотиа или Аль-Лазикани (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., *J. Mol. Biol.*, 273(4), 927 (1997); Chothia, C. *et al.*, *J Mol Biol.* Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., *J. Mol. Biol.*, 196,901 (1987); Chothia, C. *et al.*, *Nature.* Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A. *et al.*, *Sequences of Proteins of immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Marie-Paule Lefranc *et al.*, *Developmental and Comparative Immunology*, 27: 55-77 (2003); Marie-Paule Lefranc *et al.*, *Immunome Research*, 1(3), (2005); Marie-Paule Lefranc, *Molecular Biology of B cells* (second edition), chapter 26, 481-514, (2015)). Три CDR расположены между фланкирующими отрезками, известными как каркасные области (FR) (FR легкой цепи включают LFR1, LFR2, LFR3 и LFR4, и FR тяжелой цепи включают HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4), которые намного более высококонсервативны, чем CDR, и образуют каркас для поддержки высоковариабельных петель. Константные области тяжелой и легкой цепей не участвуют в связывании антигена, а выполняют различные эффекторные функции. Антитела подразделяют на классы на основании аминокислотных последовательностей константных областей их тяжелых цепей. Пятью основными классами или изоטיפами антител являются IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, которые характеризуются наличием тяжелых цепей альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Несколько из основных классов антител подразделены на подклассы, такие как IgG1 (тяжелая цепь гамма 1), IgG2 (тяжелая цепь гамма 2), IgG3 (тяжелая цепь гамма 3), IgG4 (тяжелая цепь гамма 4), IgA1 (тяжелая цепь альфа 1) или IgA2 (тяжелая цепь альфа 2).

В некоторых воплощениях антитела, предложенное в настоящем изобретении, включает любые его антигенсвязывающие фрагменты. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» при использовании в настоящем изобретении означает фрагмент антитела, образованный из части антитела, содержащей одну или более CDR, или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не обладает структурой интактного нативного антитела. Примеры антигенсвязывающего фрагмента включают, без ограничений, диатело, фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, стабилизированный дисульфидной связью фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидной связью диатело (ds-диатело), молекулу одноцепочечного антитела (scFv),

димер scFv (бивалентное диатело), биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, камелизированное однодоменное антитело, наноантитело, доменное антитело и бивалентное доменное антитело. Антигенсвязывающий фрагмент способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело.

Термин «Fab» по отношению к антителу означает ту часть антитела, которая состоит из одной легкой цепи (как варибельной, так и константной областей), связанной с варибельной областью и первой константной областью одной тяжелой цепи дисульфидной связью.

Термин «Fab'» означает фрагмент Fab, который содержит часть шарнирной области.

Термин «F(ab')₂» означает димер Fab'.

Термин «Fc» по отношению к антителу (например, изотипа IgG, IgA или IgD) означает ту часть антитела, которая состоит из второго и третьего константных доменов первой тяжелой цепи, связанных со вторым и третьим константными доменами второй тяжелой цепи посредством дисульфидных связей. Fc, относящаяся к антителу изотипа IgM и IgE, дополнительно содержит четвертый константный домен. Fc-часть антитела отвечает за различные эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ) и комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ), но не участвует в связывании антигена.

Термин «Fv» по отношению к антителу означает наименьший фрагмент антитела, несущий полный антигенсвязывающий сайт. Фрагмент Fv состоит из варибельной области одной легкой цепи, связанной с варибельной областью одной тяжелой цепи.

Термин «одноцепочечное антитело Fv» или «scFv» означает созданное генно-инженерными методами антитело, состоящее из варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи, соединенных друг с другом напрямую или через последовательность пептидного линкера (Huston JS *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 85:5879(1988)).

Термин «одноцепочечное антитело Fv-Fc» или «scFv-Fc» означает созданное генно-инженерными методами антитело, состоящее из scFv, соединенного с областью Fc антитела.

Термин «камелизированное однодоменное антитело», «антитело, состоящее только из тяжелых цепей», или «HCAb» означает антитело, которое содержит два домена V_H и не содержит легкие цепи (Riechmann L. and Muyltermans S., *J Immunol Methods*. Dec 10; 231(1-2):25-38 (1999); Muyltermans S., *J Biotechnol*. Jun;74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; патент США № 6,005,079). Антитела, состоящие только из тяжелых цепей,

изначально были получены от *Camelidae* (верблюдов, дромадеров и лам). Хотя у них отсутствуют легкие цепи, камелизированные антитела обладают аутентичным спектром связывания антигенов (Hamers-Casterman C. *et al.*, *Nature*. Jun 3; 363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. *et al. Immunogenetics*. Apr;54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. *et al. Immunology*. May; 109(1):93-101 (2003)). Вариабельный домен антитела, состоящего только из тяжелых цепей (домен V_{НН}), представляет собой наименьшую известную антигенсвязывающую единицу, генерируемую адаптивными иммунными ответами (Koch-Nolte F. *et al.*, *FASEB J*. Nov; 21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007)).

Термин «наноантитело» относится к фрагменту антитела, который состоит из домена V_{НН} из антитела, состоящего только из тяжелых цепей, и двух константных доменов, С_{Н2} и С_{Н3}.

«Диатело» или «dAb» включает малые фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, где фрагменты содержат домен V_Н, соединенный с доменом V_Л в той же полипептидной цепи (V_Н-V_Л или V_Л-V_Н) (см., например, Holliger P. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*. Jul 15;90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161). Используя линкер, который слишком короткий для того, чтобы обеспечить образование пары между двумя доменами в одной и той же цепи, домены принуждают образовывать пару с комплементарными доменами другой цепи, создавая посредством этого два антигенсвязывающих сайта. Антигенсвязывающие сайты могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены (или эпитопы). В некоторых воплощениях «биспецифическое ds-диатело» представляет собой диатело, нацеленное на два разных антигена (или эпитопа).

Термин «доменное антитело» означает фрагмент антитела, содержащий только вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи. В некоторых случаях два или более доменов V_Н ковалентно соединены посредством пептидного линкера с образованием бивалентного или мультивалентного доменного антитела. Два домена V_Н бивалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены.

Термин «валентный» при использовании в настоящем изобретении означает наличие указанного числа антигенсвязывающих сайтов в данной молекуле. Термин «моновалентный» относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, имеющим только один одиночный антигенсвязывающий сайт; а термин «мультивалентный» относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, имеющим множество антигенсвязывающих сайтов. Таким образом, термины «бивалентный», «тетравалентный» и «гексавалентный» означают наличие двух связывающих сайтов, четырех связывающих

сайтов и шести связывающих сайтов, соответственно, в антигенсвязывающей молекуле. В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются бивалентными.

При использовании в настоящем изобретении термин «биспецифическое» антитело означает искусственное антитело, которое содержит фрагменты, происходящие из двух разных моноклональных антител, и способно связываться с двумя разными эпитопами. Указанные два эпитопа могут присутствовать на одном и том же антигене, или они могут присутствовать на двух разных антигенах.

В некоторых воплощениях «димер scFv» представляет собой бивалентное диатело или биспецифический scFv (BsFv), содержащие V_H - V_L (соединенные пептидным линкером), димеризованные с другим фрагментом V_H - V_L таким образом, что V_H одного фрагмента координируется с V_L другого фрагмента с образованием двух связывающих сайтов, которые могут быть нацелены на один и тот же антиген (или эпитоп) или разные антигены (или эпитопы). В других воплощениях «димер scFv» представляет собой биспецифическое диатело, содержащее V_{H1} - V_{L2} (соединенные пептидным линкером), ассоциированные с V_{L1} - V_{H2} (тоже соединенными пептидным линкером) таким образом, что координируются V_{H1} и V_{L1} и координируются V_{H2} и V_{L2} , и каждая скоординированная пара имеет отличающуюся антигенную специфичность.

Термин «dsFv» означает стабилизированный дисульфидом фрагмент Fv, в котором связь между переменной областью одной легкой цепи и переменной областью одной тяжелой цепи является дисульфидной связью. В некоторых воплощениях «(dsFv)₂» или «(dsFv-dsFv')» содержит три пептидные цепи: два фрагмента V_H , соединенные пептидным линкером (например длинным гибким линкером) и связанные с двумя фрагментами V_L , соответственно, посредством дисульфидных мостиков. В некоторых воплощениях dsFv-dsFv' является биспецифическим, и в нем каждая объединенная в пару дисульфидом тяжелая и легкая цепь имеет отличающуюся антигенную специфичность.

Термин «химерный» при использовании в настоящем изобретении означает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие часть тяжелой и/или легкой цепи, происходящую от одного биологического вида, и остальную часть тяжелой и/или легкой цепи, происходящую от другого биологического вида. В качестве наглядного примера, химерное антитело может содержать константную область, происходящую от человека, и переменную область от животного, отличного от человека, такого как мышь. В некоторых воплощениях животное, отличное от человека, является млекопитающим, например мышью, крысой, кроликом, козой, овцой, морской свинкой или хомяком.

Термин «гуманизированный» при использовании в настоящем изобретении означает, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR, происходящие от животных, отличных от человека, области FR, происходящие от человека, и, если применимо, константные области, происходящие от человека.

Термин «аффинность» при использовании в настоящем изобретении означает силу нековалентного взаимодействия между молекулой иммуноглобулина (т.е. антителом) или ее фрагментом и антигеном.

Термин «специфическое связывание» или «специфически связывается» при использовании в настоящем изобретении означает неслучайную реакцию связывания между двумя молекулами, такую как, например, между антителом и антигеном. Специфическое связывание может быть охарактеризовано с помощью аффинности связывания, например, представленной значением K_D , т.е. соотношением скорости диссоциации и скорости ассоциации (k_{off}/k_{on}), когда связывание между антигеном и антигенсвязывающей молекулой достигает равновесия. K_D можно определить с помощью любого стандартного метода, известного специалистам в данной области техники, включая без ограничения метод поверхностного плазмонного резонанса, метод микроскопического термофореза, метод ВЭЖХ-МС и метод проточной цитометрии (такой как FACS). Значение $K_D \leq 10^{-6}$ М (например, $\leq 5 \times 10^{-7}$ М, $\leq 2 \times 10^{-7}$ М, $\leq 10^{-7}$ М, $\leq 5 \times 10^{-8}$ М, $\leq 2 \times 10^{-8}$ М, $\leq 10^{-8}$ М, $\leq 5 \times 10^{-9}$ М, $\leq 4 \times 10^{-9}$ М, $\leq 3 \times 10^{-9}$ М, $\leq 2 \times 10^{-9}$ М или $\leq 10^{-9}$ М) может указывать на специфическое связывание между антителом или его антигенсвязывающими фрагментами и IL-36R (например человеческим IL-36R).

Способность «конкурировать за связывание с человеческим IL-36R» при использовании в настоящем изобретении означает способность первого антитела или антигенсвязывающего фрагмента ингибировать связывающее взаимодействие между человеческим IL-36R и вторым антителом к IL-36R в поддающейся обнаружению степени. В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с человеческим IL-36R, ингибируют связывающее взаимодействие между человеческим IL-36R и вторым антителом к IL-36R на по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90%. В некоторых воплощениях это ингибирование может составлять более 95% или более 99%.

Термин «эпитоп» при использовании в настоящем изобретении означает специфическую группу атомов или аминокислот на антигене, с которой связывается антитело. Два антитела могут связываться с одним и тем же или близкородственными эпитопами в антигене, если они демонстрируют конкурентное связывание с антигеном.

Эпитоп может быть линейным или конформационным (т.е. содержащим аминокислотные остатки, отдаленные друг от друга). Например, если антитело или антигенсвязывающий фрагмент блокируют связывание референсного антитела с антигеном на по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, то указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно считать связывающимися с тем же/близкородственным эпитопом, что и референсное антитело.

Термин «аминокислота» при использовании в настоящем изобретении означает органическое соединение, содержащее аминную ($-NH_2$) и карбоксильную ($-COOH$) функциональные группы, а также боковую цепь, специфическую для каждой аминокислоты. Названия аминокислот также представлены в настоящем изобретении в виде стандартных однобуквенных или трехбуквенных кодов, сводная информация по которым приведена ниже.

Название аминокислоты	Трехбуквенный код	Однобуквенный код
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутаминовая кислота	Glu	E
Глутамин	Gln	Q
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y

Валин	Val	V
-------	-----	---

«Консервативная замена» по отношению к аминокислотной последовательности означает замену аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток, имеющий боковую цепь со сходными физико-химическими свойствами. Например, консервативные замены могут быть осуществлены между аминокислотными остатками с гидрофобными боковыми цепями (например, Met, Ala, Val, Leu и Ile), между аминокислотными остатками с нейтральными гидрофильными боковыми цепями (например, Cys, Ser, Thr, Asn и Gln), между аминокислотными остатками с кислыми боковыми цепями (например, Asp, Glu), между аминокислотными остатками с основными боковыми цепями (например, His, Lys и Arg) или между аминокислотными остатками с ароматическими боковыми цепями (например, Trp, Tyr и Phe). Как известно специалистам в данной области техники, консервативная замена обычно не вызывает значимого изменения конформационной структуры белка и поэтому может сохранять биологическую активность белка.

Термин «гомологичный» при использовании в настоящем изобретении относится к последовательностям нуклеиновых кислот (или их комплементарной цепи) или аминокислотным последовательностям, имеющим идентичность последовательности по меньшей мере 60% (например по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) относительно другой последовательности при оптимальном выравнивании.

«Процент (%) идентичности последовательности» по отношению к аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) определяют как процентную долю аминокислотных остатков (или оснований нуклеиновой кислоты) в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам (или основаниям нуклеиновой кислоты) в референсной последовательности после выравнивания последовательностей и, при необходимости, внесения гэпов для достижения максимального количества идентичных аминокислот (или оснований нуклеиновой кислоты). Другими словами, процент (%) идентичности последовательности аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) может быть вычислен путем деления количества аминокислотных остатков (или оснований), которые идентичны относительно референсной последовательности, с которой проводят сравнение, на общее количество аминокислотных остатков (или оснований) в кандидатной последовательности или в референсной последовательности, в зависимости от того, какая из них короче. Консервативная замена аминокислотных остатков может рассматриваться или может не рассматриваться как идентичные остатки. Выравнивание для

целей определения процента идентичности аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) может быть достигнуто, например, с помощью общедоступных инструментов, таких как BLASTN, BLASTp (доступны на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации США (NCBI), см. также Altschul S.F. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403–410 (1990); Stephen F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402 (1997)), ClustalW2 (доступен на веб-сайте Европейского института биоинформатики, см. также Higgins D.G. *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. *et al.*, *Bioinformatics* (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)) и ALIGN или программного обеспечения Megalign (DNASTAR). Специалист в данной области техники может использовать параметры по умолчанию, предлагаемые инструментом, или может изменять параметры для выравнивания при необходимости, например, выбирая подходящий алгоритм.

Термин «эффекторные функции» при использовании в настоящем изобретении означают биологические активности, приписываемые связыванию области Fc антитела с ее эффекторами, такими как комплекс C1 и рецептор Fc. Примеры эффекторных функций включают комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ), опосредуемую взаимодействием антител с C1q на комплексе C1; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), опосредуемую связыванием области Fc антитела с рецептором Fc на эффекторной клетке; и фагоцитоз. Эффекторные функции можно оценивать с помощью различных методов анализа, таких как анализ связывания с рецептором Fc, анализ связывания с C1q и анализ лизиса клеток.

«Выделенная» субстанция была изменена руками человека относительно ее природного состояния. Если «выделенная» композиция или субстанция встречаются в природе, они были изменены или извлечены из своей исходной окружающей среды, либо и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, естественным образом присутствующий в живом организме животного, не является «выделенным», но тот же самый полинуклеотид или полипептид является «выделенным», если он был в существенной степени отделен от материалов, совместно существующих с ним в его природном состоянии, таким образом, что он находится в существенно чистом состоянии. Термин «последовательность выделенной нуклеиновой кислоты» означает последовательность молекулы выделенной нуклеиновой кислоты. В некоторых воплощениях термин «выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент» означает антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, имеющие чистоту по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, определенную электрофоретическими методами (такими как электрофорез в ДСН-ПААГ, изоэлектрофокусирование, капиллярный электрофорез) или хроматографическими методами (такими как ионообменная хроматография или обращенно-фазовая ВЭЖХ).

Термин «вектор» при использовании в настоящем изобретении относится к носителю, в который генетический элемент может быть функционально вставлен таким образом, чтобы осуществлять экспрессию этого генетического элемента так, чтобы вырабатывался белок, РНК или ДНК, кодируемые генетическим элементом, или реплицировать этот генетический элемент. Вектор может быть использован для трансформации, трансдукции или трансфекции клетки-хозяина таким образом, чтобы осуществлять экспрессию генетического элемента, который он несет, внутри клетки-хозяина. Примеры векторов включают плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как дрожжевая искусственная хромосома (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома на основе ДНК бактериофага P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и вирусы животных. Вектор может содержать различные элементы для контроля экспрессии, включая последовательности промоторов, последовательности инициации транскрипции, последовательности энхансеров, селективируемые элементы и репортерные гены. Кроме того, вектор может содержать ориджин репликации. Вектор может также содержать материалы, помогающие ему проникать в клетку, включая в качестве неограничивающих примеров вирусную частицу, липосому или белковую оболочку. Вектор может представлять собой экспрессионный вектор или клонирующий вектор. Настоящее изобретение относится к векторам (например экспрессионным векторам), содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, предложенную в настоящем изобретении, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по меньшей мере один промотор (например, SV40, CMV, EF-1 α), функционально присоединенный к указанной последовательности нуклеиновой кислоты, и по меньшей мере один селективный маркер.

Фраза «клетка-хозяин» при использовании в настоящем изобретении означает клетку, в которую может быть внедрен или был внедрен экзогенный полинуклеотид и/или вектор.

Термин «субъект» включает человека и животных, отличных от человека. Животные, отличные от человека, включают всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, отличные от человека, мыши, крысы, кошки,

кролики, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии и рептилии. Если не указано иное, термины «пациент» или «субъект» используют как взаимозаменяемые.

Термин «лечить» или «лечение» заболевания, расстройства или состояния при использовании в настоящем изобретении включает предупреждение или ослабление заболевания, расстройства или состояния, замедление возникновения или скорости развития заболевания, расстройства или состояния, снижение риска развития заболевания, расстройства или состояния, предотвращение или отсрочку развития симптомов, ассоциированных с заболеванием, расстройством или состоянием, уменьшение или прекращение симптомов, ассоциированных с заболеванием, расстройством или состоянием, обеспечение полной или частичной регрессии заболевания, расстройства или состояния, излечение заболевания, расстройства или состояния или какую-либо их комбинацию.

Термины «постановка диагноза», «диагностировать» или «диагностика» относятся к выявлению патологического заболевания или состояния, такому как выявление ассоциированного с IL-36R заболевания, или относятся к выявлению субъекта с ассоциированным с IL-36R заболеванием, для которого может быть полезен конкретный режим лечения. В некоторых воплощениях диагностика включает выявление аномальных количества или активности IL-36R. В некоторых воплощениях диагностика означает выявление рака или аутоиммунного заболевания у субъекта.

При использовании в настоящем изобретении термины «биологический образец» или «образец» означают биологическую композицию, которая получена или происходит от представляющего интерес субъекта, которая содержит клеточный и/или другой молекулярный объект, который необходимо охарактеризовать и/или выявить, например, на основании физических, биохимических, химических и/или физиологических характеристик. Биологический образец включает в качестве неограничивающих примеров клетки, ткани, органы и/или биологические жидкости субъекта, полученные любым способом, известным специалистам в данной области техники. В некоторых воплощениях биологический образец представляет собой жидкий образец. В некоторых воплощениях жидкий образец является цельной кровью, плазмой, сывороткой крови, слизью (включая выделения из носа и мокроту), перитонеальной жидкостью, плевральной жидкостью, жидкостью из грудной клетки, слюной, мочой, синовиальной жидкостью, цереброспинальной жидкостью (ЦСЖ), полученной при торакоцентезе жидкостью, абдоминальной жидкостью, асцитной или перикардиальной жидкостью. В некоторых

воплощениях биологический образец является тканью или клеткой, полученными из сердца, печени, селезенки, легкого, почки, кожи или кровеносных сосудов субъекта.

Термин «IL-36R» при использовании в настоящем изобретении означает рецептор интерлейкина-36, который является поверхностным клеточным рецептором и членом семейства IL1R, которое, как известно, участвует в воспалительных ответах, запускаемых в коже и других эпителиальных тканях. IL-36R представляет собой гетеродимерный белок, состоящий из рецепторной субъединицы IL-1Rrp2 (также известной как IL-1RL2, белок 2, подобный рецептору интерлейкина 1, или белок 2, родственник рецептору интерлейкина 1) и ко-рецепторной субъединицы рецептора интерлейкина 1, IL-1RAcP, вспомогательного белка, общего с IL-1R и IL-33R. IL-36R распознает три различных агониста IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ (также известных как IL-1F6, IL-1F8 и IL-1F9), которые передают сигнал через рецепторы IL-36R/IL-1RAcP для активации NF- κ B и MAPK, таких как p38 и JNK, и способствуют воспалительному ответу и индуцируют экспрессию воспалительных цитокинов. Существуют также два антагониста рецептора, IL-36Ra и IL-38, которые связываются с рецептором IL-36 и снижают экспрессию воспалительных цитокинов.

В некоторых воплощениях IL-36R является человеческим IL-36R, содержащим человеческую IL-1Rrp2 и человеческую IL-1RAcP. В некоторых воплощениях последовательность человеческой IL-1Rrp2 доступна в Genbank под номером доступа NP_003845.2. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность человеческой IL-1Rrp2 такая, как показано в SEQ ID NO: 211. В некоторых воплощениях последовательность человеческой IL-1RAcP доступна в Genbank под номером доступа NP_002173.1. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность человеческой IL-1RAcP такая, как показано в SEQ ID NO: 212.

Аминокислотная последовательность человеческой IL-1Rrp2 (SEQ ID NO: 211):

MWSLLLCGLSIALPLSVTADGCKDIFMKNEILSASQPFANCTFPFITSGEVSVTWYKNSS
KIPVSKIIQSRIHQDETWILFLPMEWGDSGVYQCVIKGRDSCHRIHVNLTVFEKHWCDTSI
GGLPNLSDEYKQILHLGKDDSLTCHLHFPKSCVLGPIKWKDCNEIKGERFTVLETRLLV
SNVSAEDRGNYACQAILTHSGKQYEVNLGITVSITERAGYGGSPKIIYPKNHSIEVQLG
TTLIVDCNVTDTKDNTNLRWCWRVNNTLVDDYYDESKRIREGVETHVSFREHNLYTVNIT
FLEVKMEDYGLPFMCHAGVSTAYIILQLPAPDFRAYLIGGLIALVAVAVSVVYIYNIFKID
IVLWYRSAFHSTETIVDGKLYDAYVLYPKPHKESQRHAVDALVLNILPEVLERQCGYKL
FIFGRDEFPGQAVANVIDENVKLCRRLIVIVVPESLGFLLKNLSEEQIAVYSALIQDGMK
VILIELEKIEDYTVMPESIQYIKQKHGAIRWHGDFTEQSQCMKTKFWKTVRYHMPPRRR
RPFPPVQLLQHTPCYRTAGPELGSRRKKCTLTTG

Аминокислотная последовательность человеческой IL-1RAcP (SEQ ID NO: 212):
 MTLWCVVSLYFYGILQSDASERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYS
 TAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLWFRPTLLNDTGNYTCMLRN
 TTYCSKVAFPLEVVQKDSCFNSPMKLPVHKLIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTITWY
 MGCYKIQNFNNVIPEGMNLISFLIALISNNGNYTCVVTYPEPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPK
 NAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTI
 NESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAKVKQKVPAPRYT
 VELACGFGATVLLVVILIVVYHVYWLEMVLFYRAHFGTDEITLDGKEYDIYVSYARNAE
 EEEFVLLTLRGVLENEFGYKLCIFDRDSLPGGIVTDETLISFIQKSRLLVVLSPNYVLQGT
 QALLELKAGLENMASRGNINVILVQYKAVKETKVKELKRAKTVLTVIKWKGEKSKYPQ
 GRFWKQLQVAMPVKKSPRRSSSDEQGLSYSSLKNV

Термин «антитело к IL-36R» означает антитело, которое способно специфически связываться с IL-36R (например человеческим IL-36R). Термин «антитело к человеческому IL-36R» означает антитело, которое способно специфически связываться с человеческим IL-36R.

Термин «ассоциированное с IL-36R» заболевание, расстройство или состояние при использовании в настоящем изобретении означает любое заболевание или состояние, вызванное, обострившееся в результате или иным образом связанное с повышенной или пониженной экспрессией или активностями IL-36R. В некоторых воплощениях ассоциированное с IL-36R заболевание, расстройство или состояние является связанным с иммунитетом расстройством, таким как, например, аутоиммунное заболевание. В некоторых воплощениях ассоциированное с IL-36R заболевание, расстройство или состояние является расстройством, связанным с избыточной пролиферацией клеток, таким как, например, рак. В некоторых воплощениях ассоциированное с IL-36R заболевание или состояние характеризуется экспрессией или сверхэкспрессией гена IL-36R. В некоторых воплощениях ассоциированное с IL-36R заболевание или состояние характеризуется сверхэкспрессией IL-36R и/или нарушением регуляции опосредуемой IL-36R передачи сигналов.

Термин «фармацевтически приемлемый» указывает на то, что обозначенный носитель, растворитель, разбавитель, вспомогательное(-ые) вещество(-а) и/или соль в целом химически и/или физически совместимы с другими ингредиентами, составляющими композицию, и физиологически совместимы с ее реципиентом.

Термин «IL-36R-положительная клетка» при использовании в настоящем изобретении означает клетку, которая демонстрирует аномальный уровень экспрессии IL-

36R по сравнению с контрольной клеткой. Аномальный уровень экспрессии может быть повышенным или пониженным относительно уровня в контрольной клетке и может быть ассоциирован с нарушением регуляции опосредуемой IL-36R передачи сигналов. Контрольная клетка может представлять собой нормальную или здоровую аналогичную клетку, которая может экспрессировать или не экспрессировать IL-36R. В случае, если контрольная клетка экспрессирует IL-36R, аномальный уровень экспрессии в IL-36R-положительной клетке может быть повышенным или пониженным. В случае, если контрольная клетка не экспрессирует IL-36R, аномальный уровень экспрессии в IL-36R-положительной клетке может быть повышенным.

Антитела к IL-36R

Настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам. Антитела к IL-36R и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, способны специфически связываться с IL-36R.

В некоторых воплощениях антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, специфически связываются с человеческим IL-36R при значении K_D не более 10^{-7} М, не более 8×10^{-8} М, не более 5×10^{-8} М, не более 2×10^{-8} М, не более 8×10^{-9} М, не более 5×10^{-9} М, не более 2×10^{-9} М, не более 10^{-9} М, не более 8×10^{-10} М, не более 7×10^{-10} М или не более 6×10^{-10} М по данным анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), см. например, Murphy, M. *et al.*, *Current protocols in protein science*, Chapter 19, unit 19.14, 2006. В некоторых воплощениях значение K_D измеряют методом, описанным в Примере 6 настоящего описания.

Связывание антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем изобретении, с человеческим IL-36R может также быть представлено в виде значения «полуМаксимальной эффективной концентрации» (EC_{50}), которая означает концентрацию антитела, при которой наблюдается 50% от его максимального связывания. Значение EC_{50} может быть измерено с помощью анализа связывания, известного в данной области техники, например, прямого или непрямого анализа связывания, такого как иммуноферментный анализ (ELISA), анализ методом проточной цитометрии и другие виды анализа связывания. В некоторых воплощениях антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, специфически связываются с человеческим IL-36R при EC_{50} (т.е. концентрации 50% связывания) не более 1 нМ, не более 0,9 нМ, не более 0,8 нМ, не более 0,7 нМ, не более 0,6 нМ, не более 0,5 нМ, не более 0,4 нМ, не более 0,3 нМ, не более 0,2 нМ, не более 0,1 нМ, не более 0,09 нМ, не более 0,08 нМ, не более 0,07 нМ, не более 0,06 нМ или не более 0,05 нМ по данным иммуноферментного

анализа (ELISA). В некоторых воплощениях антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, специфически связываются с человеческим IL-36R при EC₅₀ (т.е. концентрации 50% связывания) не более 0,1 мкг/мл, не более 0,09 мкг/мл, не более 0,08 мкг/мл, не более 0,07 мкг/мл, не более 0,06 мкг/мл, не более 0,05 мкг/мл, не более 0,04 мкг/мл, не более 0,03 мкг/мл, не более 0,02 мкг/мл, не более 0,01 мкг/мл или не более 0,005 мкг/мл по данным ELISA. В некоторых воплощениях значение EC₅₀ измеряют методом, описанным в Примере 7 настоящего описания.

В некоторых воплощениях антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, специфически связываются с мембранным человеческим IL-36R по данным измерения методом флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS). В некоторых воплощениях антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, специфически связываются с мембранным человеческим IL-36R при аффинности связывания с EC₅₀ не более 0,5 мкг/мл, не более 0,4 мкг/мл, не более 0,3 мкг/мл, не более 0,2 мкг/мл, не более 0,19 мкг/мл, не более 0,18 мкг/мл, не более 0,17 мкг/мл, не более 0,16 мкг/мл, не более 0,15 мкг/мл или не более 0,1 мкг/мл по данным измерения методом FACS. В некоторых воплощениях значение EC₅₀ измеряют методом, описанным в Примере 8 настоящего описания.

В некоторых воплощениях антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, специфически связываются с человеческим IL-36R по данным измерения методом биослойной интерферометрии (BLI). В некоторых воплощениях антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, имеют аффинность связывания с рекомбинантным человеческим белком IL-36R с K_d не более 2×10⁻⁸ М (предпочтительно не более 1×10⁻⁸ М, например, не более 9×10⁻⁹ М, не более 8×10⁻⁹ М, не более 7×10⁻⁹ М, не более 6×10⁻⁹ М, не более 5×10⁻⁹ М, не более 4×10⁻⁹ М, не более 3×10⁻⁹ М, не более 2×10⁻⁹ М или не более 1×10⁻¹⁰ М) по данным измерения методом BLI. В некоторых воплощениях значение K_d измеряют методом, описанным в Примере 2 настоящего описания.

В некоторых воплощениях антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, не демонстрируют обнаруживаемого связывания с IL-36R яванского макака или мыши или демонстрируют связывание с IL-36R яванского макака или мыши на уровне, сопоставимом с таковым у служащего отрицательным контролем антитела при эквивалентных условиях анализа. Дополнительно, служащее

отрицательным контролем антитело может быть любым антителом, о котором известно, что оно не связывается с IL-36R яванского макака или мыши.

В некоторых воплощениях антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, способны блокировать передачу сигнала через IL-36R, индуцируемую агонистом IL-36R (таким как IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ , предпочтительно IL-36 α), по данным измерения методом репортерного анализа IL-36R. В некоторых воплощениях репортерный анализ IL-36R представляет собой анализ, описанный в Примере 3 настоящего описания.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обладают способностью ингибировать индуцируемое агонистом IL-36R высвобождение IL-6 в клетке, где агонист IL-36R включает IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ . В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обладают способностью ингибировать индуцируемое агонистом IL-36R высвобождение TNF α в клетке, где агонист IL-36R включает IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ .

Иллюстративные антитела к IL-36R

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R (например антителам к человеческому IL-36R) и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим одну или более (например 1, 2 или 3) HCDR, содержащих последовательности, выбранные из группы, состоящей из DYYX₁X₂ (SEQ ID NO: 191), LIRNKAAGYTIYYX₃X₄X₅VKG (SEQ ID NO: 192), SEQ ID NO: 19, 33, 48, 64, 79, 94, 109, 124, 139, 20, 34, 49, 65, 80, 95, 110, 125, 140, 5, 21, 35, 50, 66, 81, 96, 111, 126 и 141, где X₁ представляет собой M или L; X₂ представляет собой N, H, S или R; X₃ представляет собой S или A; X₄ представляет собой A или D; X₅ представляет собой S или P. В некоторых воплощениях настоящее изобретение дополнительно относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, имеющим не более одной, двух или трех замен аминокислотных остатков в любой из последовательностей, предложенных в настоящем изобретении.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R (например антителам к человеческому IL-36R) и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим одну или более (например 1, 2 или 3) LCDR, содержащих последовательности, выбранные из группы, состоящей из RASX₁₈NINIWLS (SEQ ID NO: 193), X₁₉QSQSYPLT (SEQ ID NO: 194), SEQ ID NO: 22, 36, 51, 67, 82, 97, 112, 127, 142, 7, 23, 37, 52, 68, 83, 98, 113, 128, 113, 24, 38, 53, 69, 84, 99, 114, 129 и 143, где X₁₈ представляет собой Q или R; X₁₉

представляет собой Q или L. В некоторых воплощениях настоящее изобретение дополнительно относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, имеющим не более одной, двух или трех замен аминокислотных остатков в любой из последовательностей, предложенных в настоящем изобретении.

Антитело «5F7» при использовании в настоящем изобретении означает моноклональное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 2.

Антитело «9A6» при использовании в настоящем изобретении означает моноклональное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 18.

Антитело «9C12» при использовании в настоящем изобретении означает моноклональное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 32.

Антитело «10D12» при использовании в настоящем изобретении означает моноклональное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 46, и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 47.

Антитело «10F6» при использовании в настоящем изобретении означает моноклональное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 62, и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 63.

Антитело «9H11» при использовании в настоящем изобретении означает моноклональное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 77, и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 78.

Антитело «1C11» при использовании в настоящем изобретении означает моноклональное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 92, и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 93.

Антитело «1A21» при использовании в настоящем изобретении означает моноклональное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую

последовательность SEQ ID NO: 107, и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 108.

Антитело «1J3» при использовании в настоящем изобретении означает моноклональное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 122, и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 123.

Антитело «1J22» при использовании в настоящем изобретении означает моноклональное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 137, и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 138.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим одну или более (например 1, 2, 3, 4, 5 или 6) последовательностей CDR антитела 5F7, 9A6, 9C12, 10D12, 10F6, 9H11, 1C11, 1A21, 1J3 или 1J22.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCDR1, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 19, 33, 48, 64, 79, 94, 109, 124 и 139, HCDR2, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 34, 49, 65, 80, 95, 110, 125 и 140, и HCDR3, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 21, 35, 50, 66, 81, 96, 111, 126 и 141, и/или LCDR1, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 36, 51, 67, 82, 97, 112, 127 и 142, LCDR2, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 23, 37, 52, 68, 83, 98, 113 и 128, и LCDR3, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 38, 53, 69, 84, 99, 114, 129 и 143.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 5, и/или LCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 8.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 19, HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO:

20, HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 21, и/или LCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 22, LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 23, и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 24.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 33, HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 34, HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 35, и/или LCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 36, LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 37, и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 38.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 48, HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 49, HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 50, и/или LCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 51, LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 52, и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 53.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 64, HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 65, HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 66, и/или LCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 67, LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 68, и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 69.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 79, HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 80, HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 81, и/или LCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 82, LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 83, и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 84.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 94, HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 95, HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 96, и/или LCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 97, LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 98, и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 99.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 109, HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 110, HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 111, и/или LCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 112, LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 113, и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 114.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 124, HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 125, HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 126, и/или LCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 127, LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 128, и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 129.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 139, HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 140, HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 141, и/или LCDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 142, LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 113, и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 143.

В Таблице 1 ниже приведены аминокислотные последовательности CDR антител 5F7, 9A6, 9C12, 10D12, 10F6, 9H11, 1C11, 1A21, 1J3 и 1J22. Границы CDR заданы или определены в соответствии с системой нумерации по Кабату. В Таблице 2 ниже приведены аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи антител 5F7, 9A6, 9C12, 10D12, 10F6, 9H11, 1C11, 1A21, 1J3 и 1J22.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности CDR 10 антител

Антитело		CDR1	CDR2	CDR3
5F7	HCDR	SEQ ID NO: 3 DYVMN	SEQ ID NO: 4 LIRNKAAGYTI YYSASVKG	SEQ ID NO: 5 DMTIYDGYV DYALDY
	LCDR	SEQ ID NO: 6 RASQNINIWLS	SEQ ID NO: 7 KASNLHT	SEQ ID NO: 8 QQSQSYPLT

9A6	HCDR	SEQ ID NO: 19 SYDVS	SEQ ID NO: 20 VIWTGGGTDY NSAFMS	SEQ ID NO: 21 VYYDPYYAMD Y
	LCDR	SEQ ID NO: 22 SASSSVSSRYL H	SEQ ID NO: 23 GTSNLAS	SEQ ID NO: 24 QQYHSDPLT
9C12	HCDR	SEQ ID NO: 33 DYHMN	SEQ ID NO: 34 RINPDYGDARY DQKFKG	SEQ ID NO: 35 DGYYVFDY
	LCDR	SEQ ID NO: 36 RSSKSLHSDG ITYLS	SEQ ID NO: 37 RMSNLVS	SEQ ID NO: 38 AQTLEFPLT
10D12	HCDR	SEQ ID NO: 48 RYWMH	SEQ ID NO: 49 NINPNIGRANY NEKFKN	SEQ ID NO: 50 PGETTDY
	LCDR	SEQ ID NO: 51 KSSQSLLYTDG KTYLN	SEQ ID NO: 52 LVSKLDS	SEQ ID NO: 53 LQSTHYPFT
10F6	HCDR	SEQ ID NO: 64 EFTIH	SEQ ID NO: 65 WFYPGSDFIKY NEKFKD	SEQ ID NO: 66 HEDRLSDYSYE WYFDV
	LCDR	SEQ ID NO: 67 RASENIDSYLA	SEQ ID NO: 68 GATLLAD	SEQ ID NO: 69 QHYYSIPLT
9H11	HCDR	SEQ ID NO: 79 HSWMN	SEQ ID NO: 80 WIHLGDGDTY YNGKFKG	SEQ ID NO: 81 SDGNYVPYAM DY
	LCDR	SEQ ID NO: 82 RASQDISNYLS	SEQ ID NO: 83 YTSRLHS	SEQ ID NO: 84 QQDSEHPWT
1C11	HCDR	SEQ ID NO: 94 NYWLH	SEQ ID NO: 95 NINPSNGGTNY NEKFKT	SEQ ID NO: 96 YSTGFAY
	LCDR	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 98 RASNLES	SEQ ID NO: 99 QQSNEDPRT

		RASESVDTYG ASFMH		
1A21	HCDR	SEQ ID NO: 109 GYFMN	SEQ ID NO: 110 RINPYNGDTFY NQKFKG	SEQ ID NO: 111 LGHWYFDV
	LCDR	SEQ ID NO: 112 RSSQSIVHSNG NTYLE	SEQ ID NO: 113 KVSNRFS	SEQ ID NO: 114 FQGSHPWT
1J3	HCDR	SEQ ID NO: 124 SYGMS	SEQ ID NO: 125 TISSYGSYTSYP DTVKG	SEQ ID NO: 126 PDYYVSTGFDY
	LCDR	SEQ ID NO: 127 RASQISDYLH	SEQ ID NO: 128 YASQIS	SEQ ID NO: 129 QNGHSFPFT
1J22	HCDR	SEQ ID NO: 139 DYTIH	SEQ ID NO: 140 WFYPGSGGLK YHEKFKD	SEQ ID NO: 141 HGNYDGFAY
	LCDR	SEQ ID NO: 142 RSSQSLVHSNG NTYLH	SEQ ID NO: 113 KVSNRFS	SEQ ID NO: 143 SQSTHVPFT

Таблица 2. Аминокислотные последовательности переменных областей 10 антител

Антитело	VH	VL
5F7	SEQ ID NO: 1 EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSC AASGFAFTDYMNWVRQPPG KALEWLALIRNKAAGYTIYYS ASVKGRFTISRDNQSILYLQM TALRPEDSATYYCVRDMTIYDG YYVDYALDYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO: 2 DIQMNQSPSSLSASLGDTITI TCRASQNINIWLWYQQKPG NIPKLFYKASNLHTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDIA TYYCQQSQSYPLTFGAGTKL ELK
	SEQ ID NO: 17 QVQLQQSGPGLMAPSQSLITC TVSGFSLTSYDVSQIRQSPGKG LEWLGVIWTGGGTDYNSAFMS	SEQ ID NO: 18 DIVLTQSPAISASPGKVTM TCSASSVSSRYLHWYQQKS GASPKLWIYGTSNLSAGVPA

	RLSITKDNSKSQVFLKMSSLQT DDTAIYYCVRVYYDPYYAMDY WGQGTSVTVSS	RFSGSGSGTSYSLTISSVEAE DAATYYCQQYHSDPLTFGA GTKLELK
9C12	SEQ ID NO: 31 EVQLQQSGPELVKPGASVKMS CKASGYTFTDYHMNVVKRSP GKSLEWIGRINPDYGDARYDQ KFKGKATLTVDKSLSTAYMQL NRLTYEDSAVYYCARDGYYVF DYWGQGSTLTVSS	SEQ ID NO: 32 DIVMTQAAFSNPVSLGTSASI SCRSSKSLHSDGITYLSWY LQRPQGSPQLLIYRMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFTLRISR VEAEDVGVYYCAQTLEFPLT FGAGTKLELK
10D12	SEQ ID NO: 46 QVQLQQPGTELVKPGASVKLS CKASGYTFTRYWMHWVRQRP GQGLEWIGNINPNIGRANYNEK FKNKATLTVDKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARPGETTDYW GQGTTLTVSS	SEQ ID NO: 47 DVVMTQTPLILSVTIGQPASI SCKSSQSLLYTDGKTYLNWL LQRPQGSPKRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAVDLGVYYCLQSTHYPFTF GTGTKLEIK
10F6	SEQ ID NO: 62 QVQLQQSGAELVKPGASVRLS CKASGYTFTEFTIHWVKQRSG QGLEWIGWFYPGSDFIKYNEKF KDKATLTADKSSNTVYMELLR LTSEDSAVYFCARHEDRLSDYS YEWYFDVWGAGTAVTVSS	SEQ ID NO: 63 DIQMTQSPASLSASVGETVTI TCRASENIDSYLAWYQQKQ GKSPQLLVYGATLLADGVPS RFSGSGSGTQYSLKINSLQSE DVAEYFCQHYYSIPLTFGAG TKLELK
9H11	SEQ ID NO: 77 QVQLQQSGPELVKPGASVKISC KASGYAFSHSWMNWVKQRPG KGLEWIGWIHLGDGDTYYNGK FKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYFCARSDGNYVPYA MDYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO: 78 DIVITQTTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISNYLSWYQQKPD GTVKLLIYYTSRLHSGVPSRF SGSGSGTDYSLTISSLEQEDI ATYFCQQDSEHPWTFGGGTE LDVR
1C11	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 93

	EVQVQQSGTELVKPGASVKLS CKASGYTFTNYWLHWVKQRP GQGLEWIGNINPSNGGTNYNE KFKTKATLTVDKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCARYSTGFAYW GQGTLVTVSA	DIVLTQTTASLAVSLGQRATI SCRASESVDTYGASFMHWY QQKPGQPPKLLIYRASNL GIPARFSGSGSRTDFTLTVNP VEADDVATYYCQQSNEDPRT FGGGTKLEIK
1A21	SEQ ID NO: 107 EVQLQQSGPELVKPGDSVKISC KASGYSFTGYFMNWVMQSHG KSLEWIGRINPYNGDTFYNQKF KGKATLTVDKSSSTAHEMELRSL TSEDSAVYYCAGLGHWYFDV WGTGTTVTVSS	SEQ ID NO: 108 DIVMTQSTLSLPVSLGDQASI SCRSSQSIVHSNGNTYLEWY LQKPGQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYYCFQGSHPVW TFGGGTKLEIK
1J3	SEQ ID NO: 122 QVQLEQSGGDLVKGGSVKLS CAASGFTFSSYGMSWVRQTPD KRLEWVATISSYGSYTSYPDTV KGRFTISRDNKNTLYLQMSL KSEDTAMYYCARPDYYVSTGF DYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO: 123 DIVITQSTATLSVTPGDRVSL CRASQISDYLHWYQQKSHE SPRLLIKYASQSIGIPSRFSG SGSGSDFTLINSVEPEDVGV YYCQNGHSFPFTFGSGTKLEI K
1J22	SEQ ID NO: 137 QVQAQQSGAVLVQPGASVKLS CKASGYTFTDYTIHWIKQRSGQ GLEWIGWFYPGSGGLKYHEKF KDKATLTADKSSSTVYMELRSL TSEDSAVYFCTRHGNYDGFAY WGQGTTLVTVSA	SEQ ID NO: 138 DIVLTQTPLSLPVSLGDQASI SYRSSQSLVHSNGNTYLHW YLQKPGQSPKLLIYKVSNR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYFCSQSTHVPF TFGSGTKLEIK

С учетом того, что каждое из антител 5F7, 9A6, 9C12, 10D12, 10F6, 9H11, 1C11, 1A21, 1J3 и 1J22 может связываться с IL-36R, и что антигенсвязывающая специфичность обеспечивается в основном областями CDR1, CDR2 и CDR3, последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антител 5F7, 9A6, 9C12, 10D12, 10F6, 9H11, 1C11, 1A21, 1J3 и 1J22 можно «смешивать и объединять» (т.е. CDR из разных антител можно смешивать и объединять, но каждое антитело должно содержать HCDR1, HCDR2 и HCDR3 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3) для создания молекул антител,

связывающихся с IL-36R, по настоящему изобретению. Связывание с IL-36R таких «смешанных и объединенных» антител можно протестировать с помощью видов анализа связывания, описанных выше и в Примерах. Предпочтительно, когда смешивают и объединяют последовательности VH CDR, последовательность HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3 из конкретной последовательности VH заменяют на структурно сходную(-ые) последовательность(-и) CDR. Аналогично, когда смешивают и объединяют последовательности VL CDR, последовательность LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3 из конкретной последовательности VL предпочтительно заменяют на структурно сходную(-ые) последовательность(-и) CDR. Специалисту в данной области техники будет вполне очевидно, что новые последовательности VH и VL могут быть созданы путем замены одной или более последовательностей областей CDR в VH и/или VL на структурно сходные последовательности из последовательностей CDR, описанных в настоящем изобретении для моноклональных антител 5F7, 9A6, 9C12, 10D12, 10F6, 9H11, 1C11, 1A21, 1J3 и 1J22.

Известно, что CDR отвечают за связывание антигена. Однако было обнаружено, что не все из 6 CDR необходимы или незаменимы. Иначе говоря, можно заменить или изменить либо модифицировать одну или более CDR в антителах к IL-36R 5F7, 9A6, 9C12, 10D12, 10F6, 9H11, 1C11, 1A21, 1J3 и 1J22, при этом в существенной степени сохранив аффинность специфического связывания с IL-36R.

В некоторых воплощениях антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат подходящие последовательности каркасной области (FR), при условии, что антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут специфически связываться с IL-36R. Последовательности CDR, приведенные в Таблице 1 выше, получены из мышинных антител, но их можно перенести в любые подходящие последовательности FR из любого подходящего биологического вида, такого как мышь, человек, крыса, кролик, помимо прочих, применяя подходящие методы, известные специалистам в данной области техники, такие как рекомбинантные методики.

В некоторых воплощениях антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, являются гуманизированными. Гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент желательны в виду их пониженной иммуногенности у человека. Гуманизированное антитело является химерным в его переменных областях, так как не являющиеся человеческими последовательности CDR перенесены к человеческим или в существенной степени человеческим последовательностям FR. Гуманизация антитела или антигенсвязывающего фрагмента может быть в существенной степени выполнена путем замены соответствующих

человеческих генов CDR в человеческом гене иммуноглобулина на не являющиеся человеческими (например, мышинные) гены CDR (см., например, Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536).

Подходящие для достижения этой цели переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи можно выбрать с помощью методов, известных специалистам в данной области техники. В иллюстративном примере может быть использован подход «наилучшего соответствия», когда проводят скрининг или анализ с помощью BLAST не являющейся человеческой (например, принадлежащей грызуну) последовательности переменного домена антитела относительно базы данных известных человеческих последовательностей переменных доменов, и человеческую последовательность, наиболее близко соответствующую не являющейся человеческой последовательности, используемой для запроса, идентифицируют и применяют в качестве человеческого каркаса для переноса не являющихся человеческими последовательностей CDR (см., например, Sims *et al.*, (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901). Альтернативно, для переноса не являющихся человеческими CDR можно применять каркасную область, полученную из консенсусной последовательности всех человеческих антител (см., например, Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623).

В Таблице 3 ниже представлены аминокислотные последовательности CDR гуманизированных антител для антитела 5F7, которые обозначены как 5F7-hu-2, 5F7-hu-3, 5F7-hu-5, 5F7-2a1, 5F7-2a6, 5F7-2a8, 5F7-2c4, 5F7-2d3, 5F7-2g10 и 5F7-2h1. Границы CDR заданы или определены в соответствии с системой нумерации по Кабату. В Таблице 4 ниже представлены аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированных антител 5F7-hu-2, 5F7-hu-3, 5F7-hu-5, 5F7-2a1, 5F7-2a6, 5F7-2a8, 5F7-2c4, 5F7-2d3, 5F7-2g10 и 5F7-2h1. В Таблице 5 ниже представлены аминокислотные последовательности FR 8 гуманизированных антител 5F7-hu-2, 5F7-hu-3, 5F7-hu-5, 5F7-2a1, 5F7-2a6, 5F7-2a8, 5F7-2c4, 5F7-2d3, 5F7-2g10 и 5F7-2h1.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности CDR 10 гуманизированных антител

Антитело		CDR1	CDR2	CDR3
5F7-hu-2	HCDR	SEQ ID NO: 3 DYYMN	SEQ ID NO: 164 LIRNKAAGYTI YYADSVKG	SEQ ID NO: 5 DMTIYDGYVD YALDY

	LCDR	SEQ ID NO: 6 RASQNINIWLS	SEQ ID NO: 7 KASNLHT	SEQ ID NO: 153 LQSQSYPLT
5F7-hu-3	HCDR	SEQ ID NO: 3 DYVMN	SEQ ID NO: 173 LIRNKAAGYTI YYSDSVKG	SEQ ID NO: 5 DMTIYDGYYVD YALDY
	LCDR	SEQ ID NO: 6 RASQNINIWLS	SEQ ID NO: 7 KASNLHT	SEQ ID NO: 153 LQSQSYPLT
5F7-hu-5	HCDR	SEQ ID NO: 3 DYVMN	SEQ ID NO: 151 LIRNKAAGYTI YYSAPVKG	SEQ ID NO: 5 DMTIYDGYYVD YALDY
	LCDR	SEQ ID NO: 6 RASQNINIWLS	SEQ ID NO: 7 KASNLHT	SEQ ID NO: 153 LQSQSYPLT
5F7-2a1	HCDR	SEQ ID NO: 180 DYVMH	SEQ ID NO: 151 LIRNKAAGYTI YYSAPVKG	SEQ ID NO: 5 DMTIYDGYYVD YALDY
	LCDR	SEQ ID NO: 152 RASRNINIWLS	SEQ ID NO: 7 KASNLHT	SEQ ID NO: 153 LQSQSYPLT
5F7-2a6	HCDR	SEQ ID NO: 3 DYVMN	SEQ ID NO: 151 LIRNKAAGYTI YYSAPVKG	SEQ ID NO: 5 DMTIYDGYYVD YALDY
	LCDR	SEQ ID NO: 152 RASRNINIWLS	SEQ ID NO: 7 KASNLHT	SEQ ID NO: 153 LQSQSYPLT
5F7-2a8	HCDR	SEQ ID NO: 3 DYVMN	SEQ ID NO: 151 LIRNKAAGYTI YYSAPVKG	SEQ ID NO: 5 DMTIYDGYYVD YALDY
	LCDR	SEQ ID NO: 152 RASRNINIWLS	SEQ ID NO: 7 KASNLHT	SEQ ID NO: 153 LQSQSYPLT
5F7-2c4	HCDR	SEQ ID NO: 184 DYVLR	SEQ ID NO: 151 LIRNKAAGYTI YYSAPVKG	SEQ ID NO: 5 DMTIYDGYYVD YALDY
	LCDR	SEQ ID NO: 152 RASRNINIWLS	SEQ ID NO: 7 KASNLHT	SEQ ID NO: 153 LQSQSYPLT
5F7-2d3	HCDR	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 151	SEQ ID NO: 5

		DYYMN	LIRNKAAGYTI YYSAPVKG	DMTIYDGYYVD YALDY
	LCDR	SEQ ID NO: 152 RASRNINIWLS	SEQ ID NO: 7 KASNLHT	SEQ ID NO: 153 LQSQSYPLT
5F7-2g10	HCDR	SEQ ID NO: 188 DYLS	SEQ ID NO: 151 LIRNKAAGYTI YYSAPVKG	SEQ ID NO: 5 DMTIYDGYYVD YALDY
	LCDR	SEQ ID NO: 152 RASRNINIWLS	SEQ ID NO: 7 KASNLHT	SEQ ID NO: 153 LQSQSYPLT
5F7-2h1	HCDR	SEQ ID NO: 3 DYYMN	SEQ ID NO: 151 LIRNKAAGYTI YYSAPVKG	SEQ ID NO: 5 DMTIYDGYYVD YALDY
	LCDR	SEQ ID NO: 152 RASRNINIWLS	SEQ ID NO: 7 KASNLHT	SEQ ID NO: 153 LQSQSYPLT

**Таблица 4. Аминокислотные последовательности переменных областей
10 гуманизированных антител**

Антитело	VH	VL
5F7-hu-2	SEQ ID NO: 162 QVQLQESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFAFTDYYMNWIRQAP GKGLEWVSLIRNKAAGYTIY YADSVKGRFTISRDNKSSLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRDM TIYDGYYVDYALDYWGQGT LTVSS	SEQ ID NO: 163 EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCRASQNINIWLWSYQQKPG QAPRLFYKASNLHTGVPAR FSGSGSGTEFTLTISLQSEDF AVYYCLQSQSYPLTFGQGTK LEIK
5F7-hu-3	SEQ ID NO: 171 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFAFTDYYMNWIRQAP GKGLEWVALIRNKAAGYTIY YSDSVKGRFTISRDNKSSLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRDM	SEQ ID NO: 172 DIVMTQSPSSVSASVGRVTI TCRASQNINIWLWSYQQKPG KAPKLFYKASNLHTGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDF ATYYCLQSQSYPLTFGQGTK LEIK

	TIYDGYVVDYALDYWGQGT LTVSS	
5F7-hu-5	SEQ ID NO: 176 EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFAFTD YYMNWVRQA PGKGLEWVAL IRNKAAGYTI Y YSAPVKGRFT ISRDDSKSTL YL QMNSLKTED TAVYYCVRDM T IYDGYVVDY ALDYWGQGT LTVSS	SEQ ID NO: 177 DIVMTQSPSSV SASVGDRVTI TCRASQNINI WLSWYQQKPG KAPKLFYKAS NLHTGVPSR FSGSGSGTD F FTLTISLQPE DF ATYYCLQSQ SYPLTFGQGT K LEIK
5F7-2a1	SEQ ID NO: 179 EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFDFTD YYMHWVRQA PGKGLEWVAL IRNKAAGYTI Y YSAPVKGRFT ISRDDSKSTL YL QMNSLKTED TAVYYCVRDM T IYDGYVVDY ALDYWGQGT LTVSS	SEQ ID NO: 150 DIVMTQSPSSV SASVGDRVTI TCRASRNINI WLSWYQQKPG KAPKLFYKAS NLHTGVPSR FSGSGSGTD F FTLTISLQPE DF ATYYCLQSQ SYPLTFGQGT K LEIK
5F7-2a6	SEQ ID NO: 182 EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFDFTD YYMNWVRQA PGKGLEWVAL IRNKAAGYTI Y YSAPVKGRFT ISRDDSKSTL YL QMNSLKTED TAVYYCVRDM T IYDGYVVDY ALDYWGQGT LTVSS	SEQ ID NO: 150 DIVMTQSPSSV SASVGDRVTI TCRASRNINI WLSWYQQKPG KAPKLFYKAS NLHTGVPSR FSGSGSGTD F FTLTISLQPE DF ATYYCLQSQ SYPLTFGQGT K LEIK
5F7-2a8	SEQ ID NO: 149 EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFAFGD YYMNWVRQA PGKGLEWVAL IRNKAAGYTI Y YSAPVKGRFT ISRDDSKSTL YL QMNSLKTED TAVYYCVRDM T	SEQ ID NO: 150 DIVMTQSPSSV SASVGDRVTI TCRASRNINI WLSWYQQKPG KAPKLFYKAS NLHTGVPSR FSGSGSGTD F FTLTISLQPE DF ATYYCLQSQ SYPLTFGQGT K LEIK

	IYDGYVVDYALDYWGQGLV TVSS	
5F7-2c4	SEQ ID NO: 183 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFAFTDYLRWVRQAP GKGLEWVALIRNKAAGYTIY YSAPVKGRFTISRDDSKSTLYL QMNSLKTEDTAVYYCVRDMT IYDGYVVDYALDYWGQGLV TVSS	SEQ ID NO: 150 DIVMTQSPSSVSASVGDRVTI TCRASRNINIWLSWYQQKPG KAPKLFYKASNLHTGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCLQSQSYPLTFGQGTK LEIK
5F7-2d3	SEQ ID NO: 185 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFNFTDYMNWVRQA PGKGLEWVALIRNKAAGYTIY YSAPVKGRFTISRDDSKSTLYL QMNSLKTEDTAVYYCVRDMT IYDGYVVDYALDYWGQGLV TVSS	SEQ ID NO: 150 DIVMTQSPSSVSASVGDRVTI TCRASRNINIWLSWYQQKPG KAPKLFYKASNLHTGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCLQSQSYPLTFGQGTK LEIK
5F7-2g10	SEQ ID NO: 187 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFAFTDYLSWVRQAP GKGLEWVALIRNKAAGYTIY YSAPVKGRFTISRDDSKSTLYL QMNSLKTEDTAVYYCVRDMT IYDGYVVDYALDYWGQGLV TVSS	SEQ ID NO: 150 DIVMTQSPSSVSASVGDRVTI TCRASRNINIWLSWYQQKPG KAPKLFYKASNLHTGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCLQSQSYPLTFGQGTK LEIK
5F7-2h1	SEQ ID NO: 189 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGYAFTDYMNWVRQA PGKGLEWVALIRNKAAGYTIY YSAPVKGRFTISRDDSKSTLYL QMNSLKTEDTAVYYCVRDMT	SEQ ID NO: 150 DIVMTQSPSSVSASVGDRVTI TCRASRNINIWLSWYQQKPG KAPKLFYKASNLHTGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCLQSQSYPLTFGQGTK LEIK

	IYDGYVVDYALDYWGQGLV TVSS	
--	-----------------------------	--

Таблица 5. Аминокислотные последовательности FR 10 гуманизированных антител

Антитело		FR1	FR2	FR3	FR4
5F7-hu-2	HFR	SEQ ID NO: 165 QVQLQESGG GLVKPGGSL RLSCAASGF AFT	SEQ ID NO: 166 WIRQAPGKG LEWVS	SEQ ID NO: 167 RFTISRDNA KSSLYLQMN SLRAEDTAV YYCVR	SEQ ID NO: 157 WGQGLVT VSS
	LFR	SEQ ID NO: 168 EIVMTQSPA TLSPGER ATLSC	SEQ ID NO: 169 WYQQKPGQ APRLFY	SEQ ID NO: 170 GVPARFSGS GSGTEFTLI SSLQSEDF VYYC	SEQ ID NO: 161 FGQGTKLEI K
5F7-hu-3	HFR	SEQ ID NO: 174 QVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAASGF AFT	SEQ ID NO: 175 WIRQAPGKG LEWVA	SEQ ID NO: 167 RFTISRDNA KSSLYLQMN SLRAEDTAV YYCVR	SEQ ID NO: 157 WGQGLVT VSS
	LFR	SEQ ID NO: 158 DIVMTQSPS SVSASVGD VTITC	SEQ ID NO: 159 WYQQKPGK APKLFY	SEQ ID NO: 160 GVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYC	SEQ ID NO: 161 FGQGTKLEI K

5F7-hu-5	HFR	SEQ ID NO: 178 EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAASGF AFT	SEQ ID NO: 155 WVRQAPGK GLEWVA	SEQ ID NO: 156 RFTISRDDSK STLYLQMNS LKTEDTAVY YCVR	SEQ ID NO: 157 WGQGLVT VSS
	LFR	SEQ ID NO: 158 DIVMTQSPS SVSASVGDR VTITC	SEQ ID NO: 159 WYQQKPGK APKLFY	SEQ ID NO: 160 GVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYC	SEQ ID NO: 161 FGQGTKLEI K
5F7-2a1	HFR	SEQ ID NO: 181 EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAASGF DFT	SEQ ID NO: 155 WVRQAPGK GLEWVA	SEQ ID NO: 156 RFTISRDDSK STLYLQMNS LKTEDTAVY YCVR	SEQ ID NO: 157 WGQGLVT VSS
	LFR	SEQ ID NO: 158 DIVMTQSPS SVSASVGDR VTITC	SEQ ID NO: 159 WYQQKPGK APKLFY	SEQ ID NO: 160 GVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYC	SEQ ID NO: 161 FGQGTKLEI K
5F7-2a6	HFR	SEQ ID NO: 181 EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAASGF DFT	SEQ ID NO: 155 WVRQAPGK GLEWVA	SEQ ID NO: 156 RFTISRDDSK STLYLQMNS LKTEDTAVY YCVR	SEQ ID NO: 157 WGQGLVT VSS
	LFR	SEQ ID NO: 158	SEQ ID NO: 159	SEQ ID NO: 160	SEQ ID NO: 161

		DIVMTQSPS SVSASVGDR VTITC	WYQQKPGK APKLFYI	GVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYC	FGQGTKLEI K
5F7-2a8	HFR	SEQ ID NO: 154 EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAASGF AFG	SEQ ID NO: 155 WVRQAPGK GLEWVA	SEQ ID NO: 156 RFTISRDDSK STLYLQMNS LKTEDTAVY YCVR	SEQ ID NO: 157 WGQGTLLVT VSS
	LFR	SEQ ID NO: 158 DIVMTQSPS SVSASVGDR VTITC	SEQ ID NO: 159 WYQQKPGK APKLFYI	SEQ ID NO: 160 GVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYC	SEQ ID NO: 161 FGQGTKLEI K
5F7-2c4	HFR	SEQ ID NO: 178 EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAASGF AFT	SEQ ID NO: 155 WVRQAPGK GLEWVA	SEQ ID NO: 156 RFTISRDDSK STLYLQMNS LKTEDTAVY YCVR	SEQ ID NO: 157 WGQGTLLVT VSS
	LFR	SEQ ID NO: 158 DIVMTQSPS SVSASVGDR VTITC	SEQ ID NO: 159 WYQQKPGK APKLFYI	SEQ ID NO: 160 GVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYC	SEQ ID NO: 161 FGQGTKLEI K
5F7-2d3	HFR	SEQ ID NO: 186 EVQLVESGG GLVKPGGSL	SEQ ID NO: 155 WVRQAPGK GLEWVA	SEQ ID NO: 156 RFTISRDDSK STLYLQMNS	SEQ ID NO: 157 WGQGTLLVT VSS

		RLSCAASGF NFT		LKTEDTAVY YCVR	
	LFR	SEQ ID NO: 158 DIVMTQSPS SVSASVGDR VTITC	SEQ ID NO: 159 WYQQKPGK APKLFY	SEQ ID NO: 160 GVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYC	SEQ ID NO: 161 FGQGKLEI K
5F7-2g10	HFR	SEQ ID NO: 178 EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAASGF AFT	SEQ ID NO: 155 WVRQAPGK GLEWVA	SEQ ID NO: 156 RFTISRDDSK STLYLQMNS LKTEDTAVY YCVR	SEQ ID NO: 157 WGQGLVT VSS
	LFR	SEQ ID NO: 158 DIVMTQSPS SVSASVGDR VTITC	SEQ ID NO: 159 WYQQKPGK APKLFY	SEQ ID NO: 160 GVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYC	SEQ ID NO: 161 FGQGKLEI K
5F7-2h1	HFR	SEQ ID NO: 190 EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAASGY AFT	SEQ ID NO: 155 WVRQAPGK GLEWVA	SEQ ID NO: 156 RFTISRDDSK STLYLQMNS LKTEDTAVY YCVR	SEQ ID NO: 157 WGQGLVT VSS
	LFR	SEQ ID NO: 158 DIVMTQSPS SVSASVGDR VTITC	SEQ ID NO: 159 WYQQKPGK APKLFY	SEQ ID NO: 160 GVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYC	SEQ ID NO: 161 FGQGKLEI K

В некоторых воплощениях гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, состоят из по существу полностью

человеческих последовательностей, за исключением последовательностей CDR, которые не являются человеческими. В некоторых воплощениях FR переменных областей и константные области, если они присутствуют, полностью или в существенной степени происходят из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. Человеческие последовательности FR и человеческие последовательности константных областей могут происходить из разных генов человеческих иммуноглобулинов, например, последовательности FR происходят из одного человеческого антитела, а константная область из другого человеческого антитела. В некоторых воплощениях гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат человеческие HFR1–4 тяжелой цепи и/или LFR1–4 легкой цепи.

В некоторых воплощениях области FR, происходящие от человека, могут содержать ту же аминокислотную последовательность, что и человеческий иммуноглобулин, из которого они происходят. В некоторых воплощениях один или более аминокислотных остатков человеческой FR заменены на соответствующие остатки из исходного не являющегося человеческим антитела. Это может быть желательно в некоторых воплощениях для того, чтобы сделать гуманизованное антитело или его фрагмент максимально возможно приближенным к структуре исходного не являющегося человеческим антитела таким образом, чтобы оптимизировать характеристики связывания (например, повысить аффинность связывания). В некоторых воплощениях гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, содержат не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замены аминокислотного остатка в каждой из последовательностей человеческих FR, или не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замены аминокислотного остатка во всех последовательностях FR переменного домена тяжелой цепи или легкой цепи. В некоторых воплощениях такое изменение аминокислотного остатка может присутствовать только в областях FR тяжелой цепи, только в областях FR легкой цепи или в обеих цепях. В некоторых воплощениях одна или более аминокислот последовательностей человеческих FR случайным образом мутированы для повышения аффинности связывания. В некоторых воплощениях одна или более аминокислот последовательностей человеческих FR подвергнуты обратной мутации до соответствующих(-ей) аминокислот(-ы) исходного не являющегося человеческим антитела таким образом, чтобы повысить аффинности связывания.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение также относится к гуманизованным антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HFR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность

X₆VQLX7ESGGGLVKPGGSLRLSCAASGX₈FX₁₀ (SEQ ID NO: 195) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности, HFR2 тяжелой цепи, содержащую последовательность WX₁₁RQAPGKGLEWVX₁₂ (SEQ ID NO: 196) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности, HFR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность RFTISRDX₁₃X₁₄KSX₁₅LYLQMNSLX₁₆X₁₇EDTAVYYCVR (SEQ ID NO: 197) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности, и HFR4 тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 157 или гомологичную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности, где X₆ представляет собой Q или E; X₇ представляет собой Q или V; X₈ представляет собой F или Y; X₉ представляет собой A, D или N; X₁₀ представляет собой T или G; X₁₁ представляет собой I или V; X₁₂ представляет собой S или A; X₁₃ представляет собой N или D; X₁₄ представляет собой A или S; X₁₅ представляет собой S или T; X₁₆ представляет собой R или K; X₁₇ представляет собой A или T.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение также относится к гуманизированным антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим LFR1 легкой цепи, содержащую последовательность X₂₀IVMTQSPX₂₁X₂₂X₂₃SX₂₄SX₂₅GX₂₆RX₂₇TX₂₈X₂₉C (SEQ ID NO: 198) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности, LFR2 легкой цепи, содержащую последовательность WYQQKPGX₃₀APX₃₁LFIY (SEQ ID NO: 199) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности, LFR3 легкой цепи, содержащую последовательность GVPX₃₂RFSGSGSGTX₃₃FTLTISLQX₃₄EDFAX₃₅YYC (SEQ ID NO: 200) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности, LFR4 легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 161 или гомологичную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности, где X₂₀ представляет собой D или E; X₂₁ представляет собой S или A; X₂₂ представляет собой S или T; X₂₃ представляет собой L или V; X₂₄ представляет собой A или V; X₂₅ представляет собой V или P; X₂₆ представляет собой D или E; X₂₇ представляет собой V или A; X₂₈ представляет собой I или L; X₂₉ представляет собой T или S, X₃₀ представляет собой Q или K; X₃₁ представляет собой K или R; X₃₂ представляет собой S или A; X₃₃ представляет собой D или E; X₃₄ представляет собой S или P; X₃₅ представляет собой T или V.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение также относится к гуманизированным антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HFR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 165, 174, 178, 181, 154, 178, 186, 178 и 190, HFR2 тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 166, 175 и 155, HFR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 167 и 156, и HFR4 тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 157; и/или LFR1 легкой цепи, содержащую последовательность из группы, состоящей из SEQ ID NO: 168 и 158, LFR2 легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 169 и 159, LFR3 легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 170 и 160, и LFR4 легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 161.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение также относится к гуманизированным антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим последовательности HFR1, HFR2, HFR3 и/или HFR4, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из: 5F7-hu-2-VH (SEQ ID NO: 162), 5F7-hu-3-VH (SEQ ID NO: 171), 5F7-hu-5-VH (SEQ ID NO: 176), 5F7-2a1-VH (SEQ ID NO: 179), 5F7-2a6-VH (SEQ ID NO: 182), 5F7-2a8-VH (SEQ ID NO: 149), 5F7-2c4-VH (SEQ ID NO: 183), 5F7-2d3-VH (SEQ ID NO: 185), 5F7-2g10-VH (SEQ ID NO: 187) и 5F7-2h1-VH (SEQ ID NO: 189).

В некоторых воплощениях настоящее изобретение также относится к гуманизированным антителам к IL-36R и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим последовательности LFR1, LFR2, LFR3 и/или LFR4, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из: 5F7-hu-2-VL (SEQ ID NO: 163), 5F7-hu-3-VL (SEQ ID NO: 172), 5F7-hu-5-VL (SEQ ID NO: 177), 5F7-2a1-VL/5F7-2a6-VL/5F7-2a8-VL/5F7-2c4-VL/5F7-2d3-VL/5F7-2g10-VL/5F7-2h1-VL (SEQ ID NO: 150).

В некоторых воплощениях гуманизированные антитела к IL-36R и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 187 и SEQ ID NO: 189;

и/или последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 177 и SEQ ID NO: 150.

В настоящем изобретении также предложены иллюстративные гуманизированные антитела 5F7, включая:

- 1) «5F7-hu-2», содержащее вариабельную область тяжелой цепи 5F7-hu-2-VH (SEQ ID NO: 162) и вариабельную область легкой цепи 5F7-hu-2-VL (SEQ ID NO: 163);
- 2) «5F7-hu-3», содержащее вариабельную область тяжелой цепи 5F7-hu-3-VH (SEQ ID NO: 171) и вариабельную область легкой цепи 5F7-hu-3-VL (SEQ ID NO: 172);
- 3) «5F7-hu-5», содержащее вариабельную область тяжелой цепи 5F7-hu-5-VH (SEQ ID NO: 176) и вариабельную область легкой цепи 5F7-hu-5-VL (SEQ ID NO: 177);
- 4) «5F7-2a1», содержащее вариабельную область тяжелой цепи 5F7-2a1-VH (SEQ ID NO: 179) и вариабельную область легкой цепи 5F7-2a1-VL (SEQ ID NO: 150);
- 5) «5F7-2a6», содержащее вариабельную область тяжелой цепи 5F7-2a6-VH (SEQ ID NO: 182) и вариабельную область легкой цепи 5F7-2a6-VL (SEQ ID NO: 150);
- 6) «5F7-2a8», содержащее вариабельную область тяжелой цепи 5F7-2a8-VH (SEQ ID NO: 149) и вариабельную область легкой цепи 5F7-2a8-VL (SEQ ID NO: 150);
- 7) «5F7-2c4», содержащее вариабельную область тяжелой цепи 5F7-2c4-VH (SEQ ID NO: 183) и вариабельную область легкой цепи 5F7-2c4-VL (SEQ ID NO: 150);
- 8) «5F7-2d3», содержащее вариабельную область тяжелой цепи 5F7-2d3-VH (SEQ ID NO: 185) и вариабельную область легкой цепи 5F7-2d3-VL (SEQ ID NO: 150);
- 9) «5F7-2g10», содержащее вариабельную область тяжелой цепи 5F7-2g10-VH (SEQ ID NO: 187) и вариабельную область легкой цепи 5F7-2g10-VL (SEQ ID NO: 150);
- 10) «5F7-2h1», содержащее вариабельную область тяжелой цепи 5F7-2h1-VH (SEQ ID NO: 189) и вариабельную область легкой цепи 5F7-2h1-VL (SEQ ID NO: 150).

Эти иллюстративные гуманизированные антитела к IL-36R сохранили емкость или аффинность специфического связывания с IL-36R и являются по меньшей мере сопоставимыми в этом аспекте с исходным мышинным антителом 5F7 или даже превосходят его. Например, данные приведены в Примерах 4–16.

В некоторых воплощениях антитела к IL-36R и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат весь или часть вариабельного домена тяжелой цепи и/или весь или часть вариабельного домена легкой цепи. В некоторых воплощениях антитело к IL-36R или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой однодоменное антитело, которое состоит из всего или части вариабельного домена тяжелой цепи, предложенного в настоящем

изобретении. Больше информации о таком однодоменном антителе доступно в данной области техники (см., например, патент США № 6248516).

В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, дополнительно содержат константную область иммуноглобулина (Ig), которая возможно дополнительно содержит константную область тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит области CH1, шарнирную и/или CH2-CH3 (или возможно области CH2-CH3-CH4). В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат константные области тяжелой цепи человеческих IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи содержит Cκ или Cλ. Константная область антител к IL-36R или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем изобретении, может быть идентична последовательности константной области дикого типа или может отличаться одной или более мутациями.

В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит область Fc. Известно, что область Fc опосредует эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ) и комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ) антитела. Области Fc разных изотипов Ig имеют разные способности к индукции эффекторных функций. Например, было выяснено, что области Fc в IgG1 и IgG3 индуцируют как АЗКЦ, так и КЗЦ более эффективно, чем таковые в IgG2 и IgG4. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат область Fc из изотипа IgG1 или IgG3, которая способна индуцировать АЗКЦ и КЗЦ; или, альтернативно, константную область из изотипа IgG4 или IgG2, которая обладает пониженной эффекторной функцией или лишена эффекторной функции. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат область Fc из человеческого IgG4 дикого типа или другие аллели человеческого IgG4 дикого типа. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат область Fc из человеческого IgG4, содержащую мутацию S228P. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат константную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 203. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат

область Fc из человеческого IgG4, содержащую мутацию M252Y/S254T/T256E (YTE). В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат область Fc из человеческого IgG4, содержащую мутацию T307Q/N434A (QA). В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат область Fc из человеческого IgG4, содержащую мутацию S228P и мутацию M252Y/S254T/T256E (YTE). В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат константную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 201. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат область Fc из человеческого IgG4, содержащую мутацию S228P и мутацию T307Q/N434A (QA). В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат константную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 204. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат область Fc из человеческого IgG4, содержащую мутацию S228P, мутацию M252Y/S254T/T256E (YTE) и мутацию T307Q/N434A (QA).

В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, имеют аффинность специфического связывания с человеческим IL-36R, которая является достаточной для обеспечения диагностического и/или терапевтического применения.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, могут представлять собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, гуманизованное антитело, химерное антитело, рекомбинантное антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, меченое антитело, бивалентное антитело, антиидиотипическое антитело или слитый белок. Рекомбинантное антитело представляет собой антитело, полученное *in vitro* с использованием рекомбинантных методик, а не в животных.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителу к IL-36R или его антигенсвязывающему фрагменту, которые не конкурируют за связывание человеческого IL-36R с антителом, выбранным из группы, состоящей из: а) антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 205, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность

SEQ ID NO: 206; b) антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 209, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 210, и где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не являются VI655130 или REGN14.

«VI655130» при использовании в настоящем изобретении означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206.

«REGN14» при использовании в настоящем изобретении означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 210.

Варианты антител

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, также включают различные варианты последовательностей антител, предложенных в настоящем изобретении.

В некоторых воплощениях варианты антител содержат одну или более модификаций или замен в одной или более последовательностях CDR, указанных в Таблицах 1 и 3 выше, одной или более не являющихся CDR последовательностях переменной области тяжелой цепи или переменной области легкой цепи, указанных в Таблицах 2 и 4 выше, и/или константной области (например, области Fc). Такие варианты сохраняют специфичность связывания с IL-36R своих исходных антител, но обладают одним или более желательными свойствами, которые им придает модификация(-ии) или замена(-ы). Например, варианты антител могут обладать улучшенной антигенсвязывающей аффинностью, улучшенной схемой гликозилирования, пониженным риском гликозилирования, пониженным дезаминированием, ослабленной(ыми) или отсутствующей(ими) эффекторной(-ыми) функцией(-ями), улучшенным связыванием с рецептором FcRn, повышенным фармакокинетическим периодом полувыведения, чувствительностью к pH и/или совместимостью с конъюгацией (например, в них вставлен один или более остатков цистеина).

Последовательность исходного антитела может быть подвергнута скринингу для выявления подходящих или предпочтительных остатков для модификации или замены с использованием способов, известных специалистам в данной области техники, например, «сканирующего аланином мутагенеза» (см., например, Cunningham and Wells (1989))

Science, 244:1081-1085). Вкратце, целевые остатки (например заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) можно идентифицировать и заменить на нейтральные или отрицательно заряженные аминокислоты (например аланин или полиаланин), получить модифицированные антитела и подвергнуть их скринингу на представляющее интерес свойство. Если замена в определенном положении аминокислоты демонстрирует представляющее интерес функциональное изменение, то указанное положение может быть идентифицировано как потенциальный остаток для модификации или замены. Потенциальные остатки можно дополнительно оценить путем замены на остаток другого типа (например, остаток цистеина, положительно заряженный остаток и т.д.).

Варианты аффинности

Варианты аффинности антител могут включать модификации или замены в одной или более последовательностях CDR, указанных в Таблицах 1 и 3 выше, одной или более последовательностях FR, указанных в Таблице 5 выше, или последовательностях переменных областей тяжелой или легкой цепей, указанных в Таблицах 2 и 4 выше. Специалист в данной области техники может легко идентифицировать последовательности FR на основании последовательностей CDR в Таблицах 1 и 3 выше и последовательностей переменных областей в Таблицах 2 и 4 выше, так как в данной области техники хорошо известно, что в переменной области область CDR фланкирована двумя областями FR. Варианты аффинности сохраняют аффинность специфического связывания с IL-36R исходного антитела или даже обладают улучшенной аффинностью специфического связывания с IL-36R по сравнению с исходным антителом. В некоторых воплощениях по меньшей мере одна (или все) из замен в последовательностях CDR, последовательностях FR или последовательностях переменных областей содержат консервативную замену.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что в последовательностях CDR, указанных в Таблицах 1 и 3 выше, и последовательностях переменных областей, указанных в Таблицах 2 и 4 выше, могут быть заменены один или более аминокислотных остатков, и при этом полученное антитело или антигенсвязывающий фрагмент сохраняют аффинность связывания или емкость связывания с IL-36R, или даже будут обладать улучшенной аффинностью или емкостью связывания. Для достижения этой цели можно использовать различные способы, известные специалистам в данной области техники. Например, можно получить и экспрессировать библиотеку вариантов антител (таких как варианты Fab или scFv) с помощью технологии фагового дисплея, а затем провести скрининг на аффинность связывания с человеческим IL-36R. В качестве другого примера, можно использовать компьютерное программное обеспечение для виртуального

моделирования связывания антител с человеческим IL-36R и идентифицировать аминокислотные остатки на антителах, которые образуют поверхность контакта для связывания. Такие остатки можно либо не подвергать замене, чтобы предотвратить снижение аффинности связывания, либо подвергнуть замене, чтобы обеспечить более сильное связывание.

В некоторых воплощениях гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, содержат одну или более замен аминокислотных остатков в одной или более последовательностях CDR и/или одной или более последовательностях FR. В некоторых воплощениях вариант аффинности содержит не более 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замены в последовательностях CDR и/или последовательностях FR суммарно.

В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты содержат 1, 2 или 3 последовательности CDR, имеющие по меньшей мере 80% (например по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичность последовательности с таковой (или таковыми), приведенной(-ыми) в Таблицах 1 и 3 выше, и при этом сохраняют аффинность специфического связывания с IL-36R на уровне, сходном с таковым у их исходного антитела, или даже более высоком, чем у их исходного антитела.

В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты содержат одну или более последовательностей вариабельной области, имеющих по меньшей мере 80% (например по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичность последовательности с таковой (или таковыми), приведенной(-ыми) в Таблицах 2 и 4 выше, и при этом сохраняют аффинность специфического связывания с IL-36R на уровне, сходном с таковым у их исходного антитела, или даже более высоком, чем у их исходного антитела. В некоторых воплощениях суммарно от 1 до 10 аминокислот было заменено, вставлено или удалено в последовательности вариабельной области, приведенной в Таблицах 2 или 4 выше. В некоторых воплощениях замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами CDR (например, в FR).

Варианты гликозилирования

Антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, также включают варианты гликозилирования, которые могут быть получены либо для повышения, либо для понижения степени гликозилирования антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать одну или более модификаций, которые вносят или удаляют сайт гликозилирования. Сайт гликозилирования представляет собой аминокислотный остаток с боковой цепью, к которой может быть присоединена углеводная группировка (например олигосахаридная структура). Гликозилирование антител в типичном случае является либо N-гликозилированием, либо O-гликозилированием. N-гликозилированием называют присоединение углеводной группировки к боковой цепи остатка аспарагина, например, остатка аспарагина в трипептидной последовательности, такой как аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X является любой аминокислотой, кроме пролина. O-гликозилированием называют присоединение одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбонильной группе, обычно к серину или треонину. Удаление нативного сайта гликозилирования может быть в одном варианте достигнуто, например, путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что одна из вышеописанных трипептидных последовательностей (в случае сайтов N-гликозилирования) или остатки серина или треонина (в случае сайтов O-гликозилирования), присутствующие в последовательности, заменяются. Сходным образом можно создать новый сайт гликозилирования путем включения такой трипептидной последовательности или остатка серина или треонина.

В некоторых воплощениях антитела к IL-36R и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат мутацию по N297 (например N297A, N297Q или N297G) для удаления сайта гликозилирования.

Созданные генно-инженерными методами варианты с цистеином

Антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, также включают созданные генно-инженерными методами варианты с цистеином, которые содержат один или более включенных свободных аминокислотных остатков цистеина.

Свободный остаток цистеина представляет собой остаток, который не является частью дисульфидного мостика. Созданный генно-инженерными методами вариант с цистеином полезен для конъюгации с, например, цитотоксическим и/или применяемым для визуализации соединением, меткой или радиоизотопом, помимо прочих, по сайту вставленного генно-инженерными методами цистеина через, к примеру, малеимид или галогенацетил. Способы создания генно-инженерными методами антител или их антигенсвязывающих фрагментов для включения свободных остатков цистеина известны специалистам в данной области техники, см., например, WO2006/034488.

Варианты Fc

Антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, также включают варианты Fc, которые содержат одну или более модификаций или замен аминокислотных остатков в области Fc и/или шарнирной области, например, чтобы обеспечить измененные эффекторные функции, такие как АЗКЦ и КЗЦ. Способы изменения активности АЗКЦ путем создания антител генно-инженерными методами описаны в данной области техники, см., например, Shields RL. *et al.*, *J Biol Chem.* 2001, 276(9): 6591-604; Idusogie EE. *et al.*, *J Immunol.* 2000, 164(8):4178-84; Steurer W. *et al.*, *J Immunol.* 1995, 155(3): 1165- 74; Idusogie EE. *et al.*, *J Immunol.* 2001, 166(4): 2571-5; Lazar GA. *et al.*, *PNAS*, 2006, 103(11): 4005-4010; Ryan MC. *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 2007, 6: 3009-3018; Richards JO, *et al.*, *Mol Cancer Ther.* 2008, 7(8): 2517-27; Shields R. L. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 26733-26740; Shinkawa T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 3466-3473.

Активность КЗЦ антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем изобретении, можно также изменить, например, путем улучшения или ослабления связывания C1q и/или КЗЦ (см., например, WO99/51642; Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; и WO94/29351 для получения информации по другим примерам вариантов области Fc). Одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322 области Fc, можно заменить на другой аминокислотный остаток, чтобы изменить связывание C1q и/или уменьшить либо подавить комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ) (см. патент США № 6194551 Idusogie et al.). Одну или более аминокислотных замен можно также включить для изменения способности антитела фиксировать комплемент (см. публикацию РСТ WO 94/29351 Vodmer et al.).

В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, обладают сниженными эффекторными функциями и содержат одну или более аминокислотных замен в IgG1 в положении, выбранном из группы, состоящей из: 234, 235, 237 и 238, 268, 297, 309, 330 и 331. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой изотип IgG1 и содержат одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из: N297A, N297Q, N297G, L235E, L234A, L235A, L234F, L235E, P331S и любой их комбинации. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой изотип IgG2 и содержат одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из: H268Q, V309L, A330S, P331S,

V234A, G237A, P238S, H268A и любой их комбинации (например, H268Q/V309L/A330S/P331S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/ P331S). В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой изотип IgG4 и содержат одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из: N297A, N297Q, N297G, L235E, L234A, L235A, M252Y/S254T/T256E, T307Q/N434 и любой их комбинации. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой перекрестный изотип IgG2/IgG4. Примеры перекрестного изотипа IgG2/IgG4 описаны в публикации Rother RP *et al.*, *Nat Biotechnol* 25:1256–1264 (2007).

В некоторых воплощениях антитела к IL-36R и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой изотип IgG4 и содержат аминокислотные замены M252Y/S254T/T256 (YTE). В некоторых воплощениях антитела к IL-36R и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой изотип IgG4 и содержат аминокислотные замены T307Q/N434A (QA).

В некоторых воплощениях антитела к IL-36R и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой изотип IgG4 и содержат одну или более аминокислотных замен, например по положению 228. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой изотип IgG4 и содержат мутацию S228P в области Fc. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат константную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 203. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой изотип IgG4 и содержат аминокислотные замены в виде мутации S228P и мутации M252Y/S254T/T256 (YTE). В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат константную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 201. В некоторых воплощениях антитела к IL-36R и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой изотип IgG4 и содержат аминокислотные замены в виде мутации S228P и мутации T307Q/N434A (QA). В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, содержат

константную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 204.

В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты содержат одну или более аминокислотных замен, которые улучшают pH-зависимое связывание с неонатальным рецептором Fc (FcRn). Такой вариант может обладать увеличенным фармакокинетическим периодом полувыведения, так как он связывается с FcRn при кислом pH, что позволяет ему избежать деградации в лизосомах и затем транслоцироваться и высвободиться из клетки. Способы создания генно-инженерными методами антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для улучшения аффинности связывания с FcRn хорошо известны специалистам в данной области техники, см., например, Vaughn, D. *et al.*, *Structure*, 6(1): 63-73, 1998; Kontermann, R. *et al.*, *Antibody Engineering*, Volume 1, Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK, published by Springer, 2010; Yeung, Y. *et al.*, *Cancer Research*, 70: 3269-3277 (2010); и Hinton, P. *et al.*, *J. Immunology*, 176:346-356 (2006).

В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты содержат одну или более аминокислотных замен на поверхности контакта области Fc для облегчения и/или стимулирования гетеродимеризации. Эти модификации включают введение выступа в полипептид первой Fc и полости в полипептид второй Fc, причем выступ может быть расположен в полости таким образом, чтобы способствовать взаимодействию полипептидов первой и второй Fc с образованием гетеродимера или комплекса. Способы получения антител с этими модификациями известны специалистам в данной области техники, например, такие как описаны в патенте США № 5731168.

Антигенсвязывающие фрагменты

В настоящем изобретении представлены также антигенсвязывающие фрагменты к IL-36R. Разные типы антигенсвязывающих фрагментов известны специалистам в данной области техники и могут быть разработаны на основании антител к IL-36R, предложенных в настоящем изобретении, включая, например, иллюстративные антитела, CDR которых показаны в Таблицах 1 и 3 выше, а переменные последовательности показаны в Таблицах 2 и 4 выше, и их различные варианты (такие как варианты аффинности, варианты гликозилирования, варианты Fc, созданные генно-инженерными методами варианты с цистеином и т.д.).

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент к IL-36R, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой диатело, фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, стабилизированный дисульфидной связью фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический

dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидной связью диатело (ds-диатело), молекулу одноцепочечного антитела (scFv), димер scFv (бивалентное диатело), мультиспецифическое антитело, камелизированное однодоменное антитело, наноантитело, доменное антитело и бивалентное доменное антитело.

Для получения таких антигенсвязывающих фрагментов можно использовать различные способы. Примеры способов включают ферментативное переваривание интактных антител (см., например, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); и Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)), рекомбинантную экспрессию клетками-хозяевами, такими как *E. coli* (например, в случае фрагментов антител Fab, Fv и ScFv), скрининг из библиотеки фагового дисплея, как обсуждалось выше (например, в случае ScFv), и химическое сочетание двух фрагментов Fab'-SH с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Другие способы получения фрагментов антител будут очевидны для специалиста в данной области техники.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент является scFv. Получение scFv описано, например, в WO 93/16185; патентах США № 5571894 и 5587458. ScFv может быть подвергнут слиянию с эффекторным белком либо по амино-, либо по карбоксильному концу с получением слитого белка (см., например, *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck).

В некоторых воплощениях антитела к П-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, являются бивалентными, тетравалентными, гексавалентными или мультивалентными. Любая молекула, которая является более чем бивалентной, считается мультивалентной, включая, например, тривалентные, тетравалентные, гексавалентные и т.д.

Бивалентная молекула может быть моноспецифической, если из двух сайтов связывания оба специфичны для связывания с одним и тем же антигеном или одним и тем же эпитопом. Это в некоторых воплощениях обеспечивает более сильное связывание с антигеном или эпитопом, чем у моновалентного аналога. Сходным образом, мультивалентная молекула может также быть моноспецифической. В некоторых воплощениях в бивалентном или мультивалентном антигенсвязывающем фрагменте первая валентность сайта связывания и вторая валентность сайта связывания структурно идентичны (т.е. имеют одинаковые последовательности) или структурно различны (т.е. имеют разные последовательности, хотя и с одинаковой специфичностью).

Бивалентный фрагмент может также быть биспецифическим, если два сайта связывания специфичны к разным антигенам или эпитопам. Это также применимо к мультивалентной молекуле. Например, тривалентная молекула может являться биспецифической, когда два сайта связывания являются моноспецифическими к первому антигену (или эпитопу), а третий сайт связывания специфичен ко второму антигену (или эпитопу).

Биспецифические антитела

В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты являются биспецифическими. В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно соединены со вторым функциональным фрагментом, имеющим другую специфичность связывания, чем у указанного антитела к IL-36R или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых воплощениях биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, способны специфически связываться со вторым антигеном, отличным от IL-36R, или вторым эпитопом на IL-36R. В некоторых воплощениях второй антиген, отличный от IL-36R, выбран из группы, состоящей из IL-17, IL-23, TNF, IL-12 и IL-1.

Конъюгаты

В некоторых воплощениях антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты дополнительно содержат одну или более конъюгированных группировок. Конъюгированная группировка может быть связана с антителами или их антигенсвязывающими фрагментами. Конъюгированная группировка является группировкой, которая может быть присоединена к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту. Подразумевается, что с антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, предложенными в настоящем изобретении, могут быть связаны различные конъюгированные группировки (см., например, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989)). Эти конъюгированные группировки могут быть связаны с антителами или их антигенсвязывающими фрагментами посредством ковалентного связывания, аффинного связывания, интеркаляции, координационного связывания, комплексообразования, ассоциирования, смешивания или добавления, среди прочих способов. В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть связаны с одним или более конъюгатами через линкер.

В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, могут быть созданы генно-инженерными методами таким образом, чтобы они содержали специфические сайты за пределами части, связывающейся с эпитопом, которые могут быть использованы для связывания с одной или более конъюгированными группировками. Например, такой сайт может включать один или более реакционно-способных аминокислотных остатков, таких как, например, остатки цистеина или гистидина, для облегчения ковалентного связывания с конъюгированной группировкой.

В некоторых воплощениях группировка антитела связана с конъюгированной группировкой через химическую связь или линкер. В некоторых воплощениях группировку антитела и конъюгированную группировку связывают с использованием различных хорошо известных бифункциональных реагентов и химических веществ, подходящих для конъюгации с белками. Такие реагенты включают без ограничений: N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (например, диметиладипимидат HQ), активные сложные эфиры (например, дисукцинимидилсуберат), альдегиды (например, глутаральдегид), бис-азидные соединения (бис-(*para*-азидобензоил)-гександиамин), производные бис-дiazония (например, бис-(*para*-дiazонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (например, толуол-2,6-диизоцианат) и соединения с двумя активными фтор-группами (например, 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть связаны с конъюгированной группировкой опосредованно, или через другую конъюгированную группировку. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, могут быть конъюгированы с биотином, затем опосредованно конъюгированы со вторым конъюгатом, который конъюгирован с авидином. В некоторых воплощениях конъюгированная группировка включает модифицирующий элиминацию агент (например полимер, такой как ПЭГ, который продлевает период полувыведения), химиотерапевтический агент, токсин, радиоактивный изотоп, лантаноид, детектируемую метку (например люминесцентную метку, флуоресцентную метку, фермент-субстратную метку), агент, алкилирующий ДНК, ингибитор топоизомеразы, агент, связывающийся с тубулином, группировку для очистки или другие терапевтические агенты или лекарственные средства.

Терапевтические агенты или лекарственные средства, полезные в качестве конъюгированной группировки, могут быть такими, которые полезны для лечения псориаза, например, ГПП (генерализованного пустулезного псориаза), ЛПП (ладонно-подошвенного пустулеза), ГГ (гнойного гидраденита) и т.п.

В некоторых воплощениях конъюгированная группировка включает иммунодепрессант на основе гормона. В некоторых воплощениях конъюгированная группировка включает глюкокортикоиды или стероиды. Неограничивающие примеры глюкокортикоидов или стероидов включают будесонид, флунизолит, триамцинолона ацетонид, флутиказона пропионат, беклометазона дипропионат и циклезонид.

В некоторых воплощениях конъюгированная группировка содержит терапевтический агент или лекарственное средство для лечения псориаза. В некоторых воплощениях конъюгированная группировка может быть небιологическим агентом, таким как метотрексат, циклоспорин, сложные эфиры фумаровой кислоты (FAE), гидроксикарбамид, фумараты (такие как диметилфумарат), ретиноиды (синтетические формы витамина А), глюкокортикоиды или стероиды. В некоторых воплощениях конъюгированная группировка может быть биологическим агентом, который прерывает иммунный процесс, вовлеченный в псориаз, нацеливаясь на специфические аспекты иммунной системы, участвующие в патогенезе псориаза. В некоторых воплощениях указанный биологический агент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нацеленные на IL17, IL12/23, IL23 и/или TNF-альфа и т.д. Примеры такого моноклонального антитела включают, без ограничений, инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб, цертолизумаба пэгол, иксекизумаб, устекинумаб, гуселькумаб, эфализумаб, алефацепт, секукинумаб и бродалумаб.

В некоторых воплощениях конъюгированная группировка содержит терапевтический агент или лекарственное средство для лечения ГПП (генерализованного пустулезного псориаза). В некоторых воплощениях конъюгированная группировка содержит терапевтический агент или лекарственное средство, такое как глюкокортикоид или стероид, этанерцепт, ПУВА, гидроксимочевина, дапсон, циклоспорин А, адалимумаб, этретинат, изотретиноин или ацитретин.

В некоторых воплощениях конъюгированная группировка содержит терапевтический агент или лекарственное средство для лечения ЛПП (ладонно-подошвенного пустулеза). В некоторых воплощениях конъюгированная группировка содержит терапевтический агент или лекарственное средство, такое как ретиноид, циклоспорин, тетрациклин, колхицин, *Tripterygium wilfordii*, *Tripterygium hypoglaucum*

Hutch или моноклональное антитело к интерлейкину 23 (такое как гуселькумаб) или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых воплощениях конъюгированная группировка содержит терапевтический агент или лекарственное средство для лечения ГГ (гнойного гидраденита). В некоторых воплощениях конъюгированная группировка содержит терапевтический агент или лекарственное средство, такое как кортикостероид, антибиотик, антиандрогенный агент или противовоспалительный агент. Примеры антибиотиков включают, без ограничений, рифампицин, клиндамицин, тетрацилин и миноциклин. Примеры антиандрогенного агента включают, без ограничений, спиронолактон, флутамид, ципротерона ацетат, этинилэстрадиол, финастерид, дутастерид и метформин. Примеры противовоспалительного агента включают, без ограничений, ингибитор TNF, такой как инфликсимаб, этанерцепт и адалимумаб.

В некоторых воплощениях конъюгированная группировка содержит обладающий ферментативной активностью токсин или его фрагмент, включая в качестве неограничивающих примеров А-цепь дифтерийного токсина, не связывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolaca americana*, ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

«Токсин» может представлять собой любой агент, который вреден для клеток или способен повреждать либо уничтожать клетки. Примеры токсинов включают, без ограничений, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, ММАЕ, ММАF, DM1, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пурамицин и его аналоги, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнитол, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP, цисплатин)), антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)),

противомитотические агенты (например, винкристин и винбластин), ингибитор топоизомеразы и агенты, связывающиеся с тубулином.

Примеры детектируемой метки могут включать флуоресцентные метки (например, флуоресцеин, родамин, дансил, фикоэритрин или техасский красный), фермент-субстратные метки (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, люциферазы, глюкоамилазу, лизоцим, оксидазы сахаридов или β -D-галактозидазу), радиоактивные изотопы, люминесцентные метки, хромофорные фрагменты, дигоксигенин, биотин/авидин, молекулы ДНК или золото для детекции. Для получения таких радиоконъюгатов доступны разнообразные радиоактивные изотопы. Примеры включают ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb и радиоактивные изотопы Lu. В некоторых воплощениях конъюгированный фрагмент может содержать радиоактивный изотоп для скинтиграфической детекции или спиновую метку для ЯМР-детекции или МРТ. Подходящие радиоактивные изотопы или спиновые метки могут включать ^{123}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N , ^{17}O , различные изотопы Gd, Mn и Fe.

В некоторых воплощениях конъюгированная группировка может представлять собой модифицирующий элиминацию агент, который помогает увеличить период полувыведения антитела. Иллюстративные примеры включают водорастворимые полимеры, такие как ПЭГ, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля и т.п. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьировать, и если присоединено более одного полимера, они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы.

В некоторых воплощениях конъюгированная группировка может представлять собой группировку для очистки, такую как магнитная гранула.

В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, используют в качестве основы для конъюгата.

Полинуклеотиды и рекомбинантные методики

Настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, которые кодируют антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении. Термин «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» при использовании в настоящем изобретении означает дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) или рибонуклеиновые кислоты (РНК) и их полимеры либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Если не указано иное, подразумевается, что конкретная

полинуклеотидная последовательность также включает ее варианты с консервативными модификациями (например, заменами вырожденных кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности так же, как явно указанную последовательность. В частности, замены вырожденных кодонов могут быть достигнуты путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или более выбранных (или всех) кодонов заменено на остатки со смесью оснований и/или на остатки дезоксиинозина (см. Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

ДНК, кодирующую моноклональное антитело, легко выделить и секвенировать с помощью стандартных методов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела). Кодированную ДНК можно также получить синтетическими методами.

Выделенный полинуклеотид, который кодирует антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, можно вставить в вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии, применяя рекомбинантные методики, известные специалистам в данной области техники. Доступно множество векторов. Компоненты вектора в общем случае включают, без ограничений, одно или более из следующего: сигнальная последовательность, ориджин репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор (например, SV40, CMV, EF-1 α) и последовательность терминации транскрипции.

В настоящем изобретении предложены векторы, содержащие выделенный полинуклеотид, предложенный в настоящем изобретении. В некоторых воплощениях полинуклеотид, предложенный в настоящем изобретении, кодирует антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, по меньшей мере один промотор (например, SV40, CMV, EF-1 α), функционально связанный с указанной последовательностью нуклеиновой кислоты, и по меньшей мере один селективный маркер. Примеры векторов включают, без ограничений, ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус, паповавирус (например, SV40), фаг лямбда и фаг M13, плазмиды pcDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos и т.д.

Векторы, содержащие полинуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, могут быть введены в клетку-хозяина для клонирования или экспрессии генов. Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, предложенных в настоящем изобретении, представляют собой клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот, описанные выше. Подходящие для этой цели прокариоты включают эубактерии, такие как грамположительные или грамотрицательные организмы, например *Enterobacteriaceae*, такие как *Escherichia*, например *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например *Serratia marcescans*, и *Shigella*, а также *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*.

В дополнение к прокариотам подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело к IL-36R, являются эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, являются наиболее часто используемыми микроорганизмами-хозяевами среди низших эукариот. Однако широко доступны и могут быть использованы в настоящем изобретении ряд других родов, видов и штаммов, такие как *Schizosaccharomyces pombe*; клетки-хозяева из рода *Kluyveromyces*, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и мицелиальные грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyposcladium*, и клетки-хозяева из рода *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем изобретении, происходят из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы различные штаммы и варианты бакуловирусов и соответствующие перmissive клетки-хозяева насекомых из таких организмов-хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Общедоступны разнообразные вирусные штаммы для трансфекции, например, вариант L-1 вируса ядерного полиэдроза (NPV), поражающего *Autographa californica*, и штамм Bm-5 вируса NPV, поражающего *Bombyx mori*, и такие вирусы могут быть использованы в качестве вирусов здесь в соответствии с настоящим изобретением, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera*

frugiperda. Культуры растительных клеток из хлопка, кукурузы, картофеля, соевых бобов, петунии, помидоров и табака также можно использовать в качестве клеток-хозяев.

Однако наибольший интерес представляют клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (тканевая культура) стало стандартной процедурой. Примерами полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия клеток эмбриональной почки человека (клетки 293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/дефицитные по дигидрофолатредуктазе (-DHFR) (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); человеческие клетки карциномы шейки матки (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); человеческие клетки легкого (W138, ATCC CCL 75); человеческие клетки печени (Hep G2, HB 8065); мышинные клетки опухоли молочной железы (MMT 060562, ATCC CCL 51); клетки TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4 и линия человеческих клеток гепатомы (Hep G2). В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой культивируемую линию клеток млекопитающих, такую как CHO, ВНК, NS0, 293 и их производные.

Клетки-хозяева трансформируют вышеописанными экспрессионными или клонирующими векторами для получения антитела к IL-36R и культивируют в стандартных питательных средах, модифицированных в зависимости от ситуации для индукции промоторов, отбора трансформированных клеток или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности. В другом воплощении антитело может быть получено с помощью гомологичной рекомбинации, известной специалистам в данной области техники. В некоторых воплощениях клетка-хозяин способна вырабатывать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение также относится к способу экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем изобретении, включающему культивирование клетки-хозяина, предложенной в настоящем изобретении, в условиях, при которых экспрессируется вектор по настоящему изобретению. Клетки-хозяева, используемые для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем изобретении, можно культивировать в различных средах. Для

культивирования клеток-хозяев подходят имеющиеся в продаже среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная питательная среда (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM, Sigma). Дополнительно, в качестве культуральной среды для клеток-хозяев можно использовать любые среды, описанные в публикациях Nam *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), патентах США № 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655 или 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; или патенте США № Re. 30,985. В любую из этих сред можно добавить при необходимости гормоны и/или другие факторы роста (такие как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), соли (такие как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферы (такие как HEPES), нуклеотиды (такие как аденозин и тимидин), антибиотики (такие как лекарственное средство ГЕНТАМИЦИН™), микроэлементы (определяемые как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях микромолярного диапазона) и глюкозу или эквивалентный источник энергии. Также можно включать любые другие необходимые добавки в соответствующих концентрациях, которые известны специалисту в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются такими же, как ранее использовали для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и они будут очевидны для специалиста в данной области техники.

При использовании рекомбинантных методик антитело может продуцироваться внутри клетки, в периплазматическом пространстве или напрямую секретироваться в среду. Если антитело продуцируется внутри клетки, в качестве первого этапа удаляют состоящий из макрочастиц дебрис (либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты), например, центрифугированием или ультрафильтрацией. В публикации Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) описан способ выделения антител, которые секретированы в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную массу размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), ЭДТА и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение примерно 30 мин. Клеточный дебрис можно удалить центрифугированием. Если антитело секретировано в среду, супернатанты из таких систем экспрессии обычно сначала концентрируют с использованием имеющегося в продаже фильтра для концентрирования белков, например, блока для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеаз, такой как PMSF, можно добавить на любом из предшествующих этапов для ингибирования протеолиза, а также можно включить антибиотики для предотвращения роста нежелательных контаминантов.

Антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, полученные из клеток, можно очистить, используя, например, хроматографию на гидроксиапатитах, гель-электрофорез, диализ, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, осаждение сульфатом аммония, высаливание и аффинную хроматографию, при этом предпочтительным способом очистки является аффинная хроматография.

В некоторых воплощениях для иммуноаффинной очистки антитела и его антигенсвязывающего фрагмента используют белок А, иммобилизованный на твердой подложке. Пригодность белка А в качестве лиганда для аффинного связывания зависит от биологического вида и изоформа любого домена Fc иммуноглобулина, который присутствует в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, основу которых составляют человеческие тяжелые цепи гамма 1, гамма 2 или гамма 4 (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендован для всех мышинных изоформ и для человеческого изоформа гамма 3 (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). Матрицей, к которой присоединен лиганд для аффинного связывания, чаще всего является агароза, но доступны и другие материалы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемой пористой структурой или полистирол-дивинилбензол, позволяют использовать более высокие скорости потока и меньшее время прохождения, чем могут быть достигнуты при использовании агарозы. Если антитело содержит домен СН3, для очистки удобно использовать смолу Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Другие способы очистки белков, такие как разделение на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на кремнеземах, хроматография на гепарин-СЕФАРОЗЕ™, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, электрофорез в ДСН-ПААГ и осаждение сульфатом аммония, также доступны в зависимости от антитела, подлежащего извлечению.

После стадии(й) предварительной очистки смесь, содержащую представляющее интерес антитело и загрязняющие вещества, можно подвергнуть хроматографии гидрофобного взаимодействия при низких значениях рН, используя элюирующий буфер при рН примерно 2,5–4,5, предпочтительно с выполнением при низких концентрациях солей (например, от 0 до 0,25 М соли).

Фармацевтическая композиция

В настоящем изобретении дополнительно предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты и один или более фармацевтически приемлемых носителей.

В настоящем изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотиды, кодирующие антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, и один или более фармацевтически приемлемых носителей. Антитела, предложенные в настоящем изобретении, могут также быть получены *in vivo* путем доставки полинуклеотидов, кодирующих антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, таких как, например, полученная при транскрипции *in vitro* мРНК или экспрессионные векторы. Специалистам в данной области техники известны способы доставки полинуклеотидов для экспрессии антител *in vivo*, см., например, Rybakova, Y. et al, *Molecular Therapy*, vol. 27 (8), pp. 1415-1423 (2019); Deal, C.E. et al, *Vaccines*, 2021, 9, 108.

В настоящем изобретении дополнительно предложены фармацевтические композиции, содержащие экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотиды, кодирующие антитела к IL-36R или их антигенсвязывающие фрагменты, и один или более фармацевтически приемлемых носителей.

В некоторых воплощениях экспрессионный вектор включает вирусный вектор или невирусный вектор. Примеры вирусных векторов включают, без ограничений, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусный вектор, ретровирусный вектор и аденовирусный вектор. Примеры невирусных векторов включают, без ограничений, «голую» ДНК, плазмиду, экзосому, мРНК и т.п. В некоторых воплощениях экспрессионный вектор подходит для генной терапии у человека. Подходящие векторы для генной терапии включают, например, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) или аденовирусный вектор. В некоторых воплощениях экспрессионный вектор включает ДНК-вектор или РНК-вектор. В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемые носители представляют собой полимерные вспомогательные вещества, такие как, без ограничений, микросферы, микрокапсулы, полимерные мицеллы и дендримеры. Полинуклеотиды или полинуклеотидные векторы по настоящему изобретению могут быть инкапсулированы, прикреплены к компонентам на основе полимеров или нанесены в виде покрытия на компоненты на основе полимеров способами, известными специалистам в данной области техники (см., например, W. Heiser, *Nonviral gene transfer techniques*, published by Humana Press, 2004; U.S. patent 6025337; *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(15): 2177-2202 (2005)).

Фармацевтически приемлемые носители для использования в фармацевтических композициях, предложенных в настоящем изобретении, могут включать, например, фармацевтически приемлемые носители в виде жидкости, геля или твердого вещества,

водные носители, неводные носители, противомикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, анестетики, суспендирующие/диспергирующие агенты, связывающие или хелатирующие агенты, разбавители, адъюванты, вспомогательные вещества или нетоксичные вспомогательные субстанции, другие компоненты, известные специалистам в данной области техники, или различные их комбинации.

Подходящие компоненты могут включать, например, антиоксиданты, наполнители, связующие вещества, разрыхлители, буферы, консерванты, смазывающие вещества, вкусоароматические добавки, загустители, красители, эмульгаторы или стабилизаторы, такие как сахара и циклодекстрины. Подходящие антиоксиданты могут включать, например, метионин, аскорбиновую кислоту, ЭДТА, тиосульфат натрия, платину, каталазу, лимонную кислоту, цистеин, тиоглицерин, тиогликолевую кислоту, тиосорбитол, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол и/или пропилгаллат. Как описано в настоящем изобретении, включение одного или более антиоксидантов, таких как метионин, в композицию, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и конъюгаты, предложенные в настоящем изобретении, снижает окисление антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Это снижение окисления предотвращает или уменьшает потерю аффинности связывания, улучшая посредством этого стабильность и максимизируя срок годности антитела. Таким образом, в некоторых воплощениях предложены фармацевтические композиции, которые содержат одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем изобретении, и один или более антиоксидантов, таких как метионин. Дополнительно предложены способы предотвращения окисления, увеличения срока годности и/или улучшения эффективности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем изобретении, посредством смешивания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с одним или более антиоксидантами, такими как метионин.

В качестве дополнительных примеров, фармацевтически приемлемые носители могут включать, например, водные носители, такие как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильную воду для инъекций или раствор декстрозы и Рингер-лактата для инъекций, неводные носители, такие как нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло или арахисовое масло, противомикробные агенты в бактериостатических или фунгистатических концентрациях, изотонические агенты, такие как хлорид натрия или декстроза, буферы, такие как фосфатный или цитратный буферы, антиоксиданты, такие как бисульфат натрия, местные анестетики, такие

как гидрохлорид прокаина, суспендирующие и диспергирующие агенты, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, гидроксипропилметилцеллюлоза или поливинилпирролидон, эмульгирующие агенты, такие как полисорбат 80 (ТВИН-80), связывающие или хелатирующие агенты, такие как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ЭГТА (этиленгликольтетрауксусная кислота), этиловый спирт, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, гидроксид натрия, хлористоводородная кислота, лимонная кислота или молочная кислота. К фармацевтическим композициям в многодозовых контейнерах можно добавить противомикробные агенты, используемые в качестве носителей, которые включают фенолы или крезолы, ртутьсодержащие соединения, бензиловый спирт, хлоробутанол, метиловый и пропиловый сложные эфиры *пара*-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Подходящие вспомогательные вещества могут включать, например, воду, раствор хлорида натрия, декстрозу, глицерин или этанол. Подходящие нетоксичные вспомогательные субстанции, могут включать, например, смачивающие или эмульгирующие агенты, буферные агенты для поддержания pH, стабилизаторы, усилители растворимости или такие агенты, как ацетат натрия, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат или циклодекстрин.

Фармацевтические композиции могут представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, драже, капсулу, таблетку, состав пролонгированного действия или порошок. Пероральные составы могут содержать стандартные носители, такие как имеющие фармацевтическое качество маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, поливинилпирролидон, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.д.

В некоторых воплощениях фармацевтические композиции приготовлены в виде инъекционной композиции. Инъекционные фармацевтические композиции могут быть получены в любой стандартной форме, такой как, например, жидкий раствор, суспензия, эмульсия или твердые формы, подходящие для получения жидкого раствора, суспензии или эмульсии. Препараты для инъекции могут включать стерильные и/или апирогенные растворы, готовые для инъекции, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для объединения с растворителем непосредственно перед применением, включая таблетки для приготовления растворов для подкожного введения, стерильные суспензии, готовые для инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для объединения с носителем непосредственно перед применением, и стерильные и/или апирогенные эмульсии. Растворы могут быть водными или неводными.

В некоторых воплощениях парентеральные препараты со стандартной дозой упакованы в ампулу, флакон или шприц с иглой. Как известно и практикуется в данной

области техники, все препараты для парентерального введения должны быть стерильными или апирогенными.

В некоторых воплощениях стерильный лиофилизированный порошок получают, растворяя антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, в подходящем растворителе. Растворитель может содержать вспомогательное вещество, которое улучшает стабильность, или другие фармакологические компоненты порошка или восстановленного раствора, полученного из указанного порошка. Вспомогательные вещества, которые могут быть использованы, включают, без ограничений, воду, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другие подходящие агенты. Раствор может содержать буфер, такой как цитратный, натрий- или калий-фосфатный или другой подобный буфер, известный специалисту в данной области техники, в одном воплощении имеющий примерно нейтральный pH. Дальнейшая стерильная фильтрация раствора, за которой следует лиофилизация в стандартных условиях, известных специалисту в данной области техники, позволяют получить желаемую композицию. В одном воплощении полученный в результате раствор разделяют на аликвоты во флаконы для лиофилизации. Каждый флакон может содержать одну дозу или множество доз антитела к IL-36R или его антигенсвязывающего фрагмента или их композиции. Приемлемо заполнение флаконов с небольшим избытком относительно количества, необходимого для дозы или набора доз (например, примерно 10%), чтобы облегчить точный отбор образца и точное дозирование. Лиофилизированный порошок можно хранить в подходящих условиях, таких как температура примерно от 4°C до комнатной.

В результате восстановления лиофилизованного порошка водой для инъекций получают композицию для применения в парентеральном введении. В одном воплощении для восстановления к лиофилизованному порошку добавляют стерильную и/или апирогенную воду или другой подходящий жидкий носитель. Точное количество зависит от выбранной проводимой терапии и может быть определено эмпирически.

Наборы

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к набору, содержащему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении. В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к набору, содержащему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, и второй терапевтический агент.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент может представлять собой агент, который полезен для лечения псориаза, например, ГПП (генерализованного пустулезного псориаза), ЛПП (ладонно-подошвенного пустулеза), ГГ (гнойногидраденита), болезни Бехчета и т.п.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой иммунодепрессант на основе гормона. В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент включает глюкокортикоиды или стероиды. Неограничивающие примеры глюкокортикоидов или стероидов включают будесонид, флунизолид, триамцинолона ацетонид, флутиказона пропионат, беклометазона дипропионат и циклезонид.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой терапевтический агент или лекарственное средство для псориаза. В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент может быть небактериальным агентом, таким как метотрексат, циклоспорин, сложные эфиры фумаровой кислоты (FAE), гидроксикарбамид, фумараты (такие как диметилфумарат), ретиноиды (синтетические формы витамина А), глюкокортикоиды или стероиды. В некоторых воплощениях второй терапевтический агент может быть биологическим агентом, который прерывает иммунный процесс, вовлеченный в псориаз, нацеливаясь на специфические аспекты иммунной системы, участвующие в патогенезе псориаза. В некоторых воплощениях указанный биологический агент представляет собой моноклональное антитело, нацеленное на IL17, IL12/23, IL23 и/или TNF-альфа и т.д. Примеры такого моноклонального антитела включают, без ограничений, инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб, цертолизумаб пэгол, иксекизумаб, устекинумаб, гуселькумаб, эфализумаб, алефацепт, секукинумаб и бродалумаб.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой терапевтический агент или лекарственное средство для ГПП (генерализованного пустулезного псориаза). В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент включает терапевтический агент или лекарственное средство, такое как глюкокортикоид или стероид, этанерцепт, ПУВА, гидроксимочевина, дапсон, циклоспорин А, адалимумаб, этретинат, изотретиноин или ацитретин.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой терапевтический агент или лекарственное средство для ЛПП (ладонно-подошвенного пустулеза). В некоторых воплощениях второй терапевтический агент включает терапевтический агент или лекарственное средство, такое как ретиноид, циклоспорин,

тетрациклин, колхицин, *Tripterygium wilfordii*, *Tripterygium hypoglaucum* Hutch, моноклональное антитело к интерлейкину 23 (такое как гуселькумаб).

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой терапевтический агент или лекарственное средство для ГГ (гнойного гидраденита). В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент включает терапевтический агент или лекарственное средство, такое как кортикостероид, антибиотик, антиандрогенный агент, противовоспалительный агент. Примеры антибиотиков включают, без ограничений, рифампицин, клиндамицин, тетрациклин и миноциклин. Примеры антиандрогенного агента включают, без ограничений, спиронолактон, флутамид, ципротерона ацетат, этинилэстрадиол, финастерид, дутастерид и метформин. Примеры противовоспалительного агента включают, без ограничений, ингибитор TNF, такой как инфликсимаб, этанерцепт и адалимумаб.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой терапевтический агент или лекарственное средство для болезни Бехчета. В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент включает терапевтический агент или лекарственное средство, такое как местные лекарственные средства, кортикостероиды, метотрексат, колхицин, талидомид, азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, микофенолата мофетил и антагонисты фактора некроза опухоли. Примеры антагонистов фактора некроза опухоли включают, без ограничений, инфликсимаб, этанерцепт и апремиласт.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой лекарственное средство, нацеленное на IL-17, IL-23, TNF, IL-12, IL-1 и т. д.

Такие наборы могут дополнительно включать, при необходимости, один или более различных стандартных компонентов фармацевтических наборов, таких как, например, контейнеры с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, дополнительные контейнеры и т.д., что будет очевидно специалисту в данной области техники. Инструкции в виде либо листков-вкладышей, либо этикеток, указывающие количества компонентов для введения, руководства по введению и/или руководства по смешиванию компонентов также могут быть включены в указанный набор.

Композиция химерных антигенных рецепторов (CAR)

Настоящее изобретение также относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), содержащим антигенсвязывающий домен к IL-36R, как предложено здесь, и домен активации Т-клеток. Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой созданные генно-инженерными методами химерные рецепторы, в которых объединены

антигенсвязывающий домен антитела с одним или более сигнальными доменами для активации Т-клеток. Иммунные клетки, такие как Т-клетки и натуральные киллерные (NK) клетки, можно изменить генно-инженерными методами так, чтобы они экспрессировали CAR. Т-клетки, экспрессирующие CAR, называют CAR-Т-клетками. CAR может опосредовать антиген-специфическую клеточную иммунную активность в Т-клетках, придавая CAR-Т-клеткам способность уничтожать клетки (например опухолевые клетки), экспрессирующие целевой антиген. В одном воплощении связывание CAR-Т-клеток, предложенных в настоящем изобретении, с IL-36R, экспрессируемым на клетках, таких как раковые клетки, приводит к пролиферации и/или активации указанных CAR-Т-клеток, при этом указанные активированные CAR-Т-клетки могут высвобождать цитотоксические факторы, например перфорин, гранзимы и гранулизин, и запускать цитолиз и/или апоптоз раковых клеток.

В некоторых воплощениях домен активации Т-клеток в CAR содержит костимулирующий сигнальный домен и сигнальный домен TCR, которые могут быть соединены друг с другом в случайном или определенном порядке, возможно с помощью короткого пептидного линкера, имеющего длину, например, от 2 до 10 аминокислот (например, дублетный линкер глицин-серин).

В некоторых воплощениях CAR дополнительно содержит трансмембранный домен. При экспрессии в клетках антигенсвязывающий домен к IL-36R является внеклеточным, а домен активации Т-клеток является внутриклеточным.

В некоторых воплощениях CAR содержит антигенсвязывающий домен к IL-36R, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен TCR, где антигенсвязывающий домен специфически связывается с IL-36R и содержит антигенсвязывающий фрагмент антител, предложенных в настоящем изобретении.

1. Антигенсвязывающий домен

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен к IL-36R в CAR содержит одну или более последовательностей CDR, предложенных в настоящем изобретении, один или более переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи, предложенных в настоящем изобретении, или один или более антигенсвязывающих фрагментов, происходящих из любого из антител к IL-36R, предложенных в настоящем изобретении.

В некоторых воплощениях полезно, чтобы антигенсвязывающий домен происходил из того же биологического вида, в котором в конечном итоге будут использовать CAR. Например, для применения у человека может быть полезно, чтобы в CAR применялся

антигенсвязывающий домен, происходящий из человеческого антитела или гуманизированного антитела. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv). В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен может существовать в различных других формах, включая, например, Fv, Fab и (Fab')₂, а также в виде бифункциональных (т.е. биспецифических) гибридных фрагментов антитела (например, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен содержит Fab или scFv.

2. Трансмембранный домен

В некоторых воплощениях CAR содержит трансмембранный домен, слитый с внеклеточным антигенсвязывающим доменом в CAR. В одном воплощении трансмембранный домен может быть выбран таким образом, что он естественным образом ассоциирован с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован так, чтобы избежать связывания с трансмембранными доменами других членов комплекса рецептора Т-клеток.

Трансмембранный домен в CAR, предложенном в настоящем изобретении, может происходить из трансмембранных доменов любого природного мембраносвязанного или трансмембранного белка, такого как, например, альфа-, бета- или зета-цепь рецептора Т-клеток, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В некоторых воплощениях трансмембранный домен в CAR может также содержать различные человеческие шарнирные области, такие как шарнирная область человеческого Ig (иммуноглобулина).

Альтернативно, трансмембранный домен в CAR, предложенном в настоящем изобретении, может быть синтетическим, например, содержащим преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В одном воплощении на каждом конце синтетического трансмембранного домена включен триплет фенилаланина, триптофана и валина. Возможно короткий олиго- или полипептидный линкер, длиной от 2 до 10 аминокислот, может образовывать связь между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом в CAR. В частности, подходящим линкером является дублет глицин-серин.

3. Сигнальный домен TCR

Домен активации Т-клеток в CAR, предложенных в настоящем изобретении, содержит сигнальный домен TCR. Сигнальный домен TCR способен активировать Т-клетку, которая экспрессирует CAR, к проявлению по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций TCR Т-клеток, например, цитолитической активности или

хелперной активности, включая секрецию цитокинов. Сигнальный домен TCR может быть либо полноразмерным природным внутриклеточным доменом передачи сигнала, либо его фрагментом, достаточным для передачи сигнала эффекторной функции TCR.

Примеры внутриклеточных сигнальных доменов, полезных для использования в CAR, предложенных в настоящем изобретении, включают цитоплазматические последовательности рецептора Т-клеток (TCR) и корецепторов, которые действуют совместно для инициации передачи сигнала после вхождения антигена в контакт с рецептором, а также любое производное или вариант этих последовательностей и любую синтетическую последовательность, имеющую такую же функциональную способность.

Сигнальный домен TCR, который действует как стимулятор, может содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные мотивы активации на основе тирозина, или ITAM. Примеры ITAM-содержащих сигнальных доменов TCR, полезных для использования в CAR, предложенных в настоящем изобретении, включают таковые, происходящие из TCR зета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых воплощениях сигнальный домен TCR содержит цитоплазматическую сигнальную последовательность, происходящую из CD3-зета.

4. Костимулирующая сигнальная область

В некоторых воплощениях домен активации Т-клеток в CAR, предложенных в настоящем изобретении, может дополнительно содержать костимулирующую сигнальную область. Костимулирующая сигнальная область действует независимым от антигена образом, опосредуя активацию TCR, и может происходить из костимулирующей молекулы, необходимой для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Примеры костимулирующих молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, ассоциированный с функциями лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т.п.

5. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR

В одном аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим CAR, предложенные в настоящем изобретении, содержащим первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антигенсвязывающий домен CAR, предложенный в настоящем изобретении, и возможно вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую трансмембранный домен и домен активации Т-клеток, предложенные в настоящем изобретении. В некоторых воплощениях последовательность, кодирующая

антигенсвязывающий домен, функционально связана с последовательностью, кодирующей трансмембранный домен и домен активации Т-клеток. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие желаемые молекулы, могут быть получены с использованием рекомбинантных методик, известных специалистам в данной области техники, таких как, например, скрининг библиотек из клеток, экспрессирующих ген, получение гена из вектора, о котором известно, что он содержит этот ген, или выделение непосредственно из клеток и тканей, содержащих этот ген, с использованием стандартных методик. В соответствии с другим воплощением представляющий интерес ген можно получить синтетически, а не клонировать.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к векторам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, предложенный в настоящем изобретении. В некоторых воплощениях вектор представляет собой ретровирусную или лентивирусную векторную конструкцию, экспрессирующую CAR по настоящему изобретению, которую можно напрямую трансдуцировать в клетку, или РНК-конструкцию, которую можно напрямую трансфицировать в клетку.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенным клеткам, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, и/или экспрессируют CAR, предложенный в настоящем изобретении.

В некоторых воплощениях клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, или экспрессирующая CAR, выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, НК-клетки, цитотоксического Т-лимфоцита (CTL) и регуляторной Т-клетки. В одном воплощении клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, или экспрессирующая CAR, демонстрирует противоопухолевый иммунный ответ, когда антигенсвязывающий домен CAR связывается со своим соответствующим антигеном. Цитотоксические лимфоциты предпочтительно будут представлять собой аутологичные клетки, хотя могут быть использованы и гетерологичные клетки или аллогенные клетки. При использовании в настоящем изобретении «аутологичный» означает любой материал, происходящий из того же индивидуума, которому его позже повторно вводят.

В одном аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к способам стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа на экспрессирующие IL-36R клетки или ткани в организме субъекта, включающим введение указанному субъекту эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии CAR, предложенного в настоящем изобретении.

В одном аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к способам лечения млекопитающего, имеющего заболевание, расстройство или состояние, ассоциированное с повышенной экспрессией IL-36R, включающим введение указанному млекопитающему эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии CAR, предложенного в настоящем изобретении, посредством чего осуществляется лечение указанного млекопитающего. В определенных воплощениях указанная клетка представляет собой аутологичную Т-клетку. В определенных воплощениях у указанного млекопитающего диагностировано заболевание, расстройство или состояние, ассоциированное с повышенной экспрессией IL-36R.

Способы применения

В одном аспекте предложены способы лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта, для которого полезно модулирование активности IL-36R. В другом аспекте предложены способы лечения ассоциированных с IL-36R заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом. В другом аспекте предложены способы лечения заболевания, расстройства или состояния, реагирующего на ингибирование IL-36R, у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых воплощениях способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем изобретении, или полинуклеотида, кодирующего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенного в настоящем изобретении, и/или фармацевтической композиции, предложенной в настоящем изобретении. В некоторых воплощениях указанный субъект является человеком.

Известно, что IL-36R играет роль в патогенезе нескольких заболеваний, таких как псориаз и т.д. Например, результаты экспериментов показали, что у пациентов с псориазом уровни IL-36 (α , β и γ) повышены в сыворотке и пораженных участках кожи и коррелируют с активностью заболевания, а недостаточность IL-36Ra или сверхэкспрессия лигандов-агонистов IL-36 могут приводить к пустулезному псориазу. Передача сигнала через IL-36R является ключевым движущим фактором при пустулезном псориазе. Передача сигнала через IL-36R играет центральную роль при гнойном гидрадените. У пациентов с ихтиозом повышены уровни мРНК IL-36 (α , β и γ) и широко распространена экспрессия IL-36R в пораженных участках кожи.

В некоторых воплощениях ассоциированное с IL-36R заболевание или расстройство представляет собой IL-36R-положительное заболевание или расстройство. В некоторых воплощениях субъект, которого будут лечить, идентифицирован как имеющий IL-36R-

положительное заболевание или расстройство. В некоторых воплощениях ассоциированное с IL-36R заболевание, расстройство или состояние реагирует на ингибирование IL-36R. В некоторых воплощениях ассоциированное с IL-36R заболевание, расстройство или состояние сопровождается нарушением регуляции опосредуемой IL-36R передачи сигнала или, в частности, сопровождается повышенной передачей сигнала через IL-36R.

В некоторых воплощениях указанное заболевание или расстройство ассоциировано с нарушением регуляции IL-36R-опосредованной передачи сигнала в клетках. В некоторых воплощениях указанное нарушение регуляции IL-36R-опосредованной передачи сигнала включает нарушение регуляции IL-36 (например IL-36 α , IL-36 β или IL-36 γ), антагониста IL-36R и/или IL-38. В некоторых воплощениях указанное нарушение регуляции IL-36R-опосредованной передачи сигнала включает избыточную активацию IL-36 (например IL-36 α , IL-36 β или IL-36 γ), или избыточное подавление антагониста IL-36R, или избыточное подавление IL-38 по сравнению с контрольным уровнем (например уровнем у здорового субъекта).

В некоторых воплощениях заболевание или расстройство представляет собой воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание, респираторное заболевание, болезнь обмена веществ или рак.

В некоторых воплощениях воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из: аллергического воспаления кожи, легких и желудочно-кишечного тракта, атопического дерматита (также известного как атопическая экзема), астмы (аллергической и неаллергической), опосредованного эпителием воспаления, фиброза (например, идиопатического легочного фиброза, склеродермии, фиброза почек и рубцевания), аллергического ринита, видов пищевой аллергии (например, аллергии на арахис, яйца, молочные продукты, морепродукты, лесные орехи и т.д.), видов сезонной аллергии и других видов аллергии. В некоторых воплощениях воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из аллергического воспаления кожи, легких и желудочно-кишечного тракта, атопического дерматита (также известного как атопическая экзема), астмы (аллергической и неаллергической) и опосредованного эпителием воспаления.

В некоторых воплощениях аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из: рассеянного склероза, астмы, сахарного диабета 1-го типа, ревматоидного артрита, склеродермии, болезни Крона, псориаза обыкновенного (часто называемого псориазом), гнойного гидраденита, генерализованного пустулезного псориаза (ГПП), ладонно-подошвенного пустулеза (ЛПП), воспалительного заболевания кишечника, псориатического артрита, системной красной волчанки (СКВ), язвенного колита,

анкилозирующего спондилита, атопического дерматита и угрей обыкновенных. В некоторых воплощениях способ, предложенный в настоящем изобретении, полезен для лечения пустулезного псориаза, генерализованного пустулезного псориаза, ладонно-подошвенного пустулеза (ЛПП), псориаза обыкновенного, атопического дерматита и угрей обыкновенных. В некоторых воплощениях аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из псориаза обыкновенного (часто называемого псориазом), гнойного гидраденита, генерализованного пустулезного псориаза (ГПП), ладонно-подошвенного пустулеза (ЛПП), воспалительного заболевания кишечника, атопического дерматита, угрей обыкновенных и болезни Бехчета.

В некоторых воплощениях респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, муковисцидоза, эмфиземы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и острого респираторного дистресс-синдрома.

В некоторых воплощениях болезнь обмена веществ выбрана из группы, состоящей из ожирения, диабета 2-го типа, атеросклероза и сердечно-сосудистого заболевания.

В некоторых воплощениях рак может представлять собой любой тип рака, известный в данной области, включая без ограничения меланому, почечно-клеточную карциному, рак легких, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак гортани, рак печени, рак щитовидной железы, рак желудка, рак слюнной железы, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, лейкоз, лимфому и карциному из клеток Меркеля.

В некоторых воплощениях заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из псориаза, пустулезного псориаза, гнойного гидраденита, ихтиоза, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), атопического дерматита, угрей обыкновенных и болезни Бехчета.

Присутствие и/или количество IL-36R в представляющем интерес биологическом образце может служить показателем вероятности того, может ли субъект, от которого получен указанный биологический образец, дать ответ на антитело к IL-36R. Для определения присутствия и/или количества IL-36R в испытуемом биологическом образце от субъекта можно использовать различные методы. Например, тестируемый биологический образец можно обработать антителом к IL-36R или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с экспрессированным белком IL-36R и детектируют его. В соответствии с другим воплощением IL-36R также можно детектировать на уровне экспрессии нуклеиновых кислот, используя такие методы, как количественная ПЦР (кПЦР), обратная транскрипция с ПЦР, анализ на микрочипах,

серийный анализ экспрессии генов (SAGE), флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) и т.п. В некоторых воплощениях тестируемый образец происходит из эпителиальной ткани. В определенных воплощениях наличие или повышенный уровень IL-36R в тестируемом биологическом образце указывает на вероятность ответа на лечение. Термин «повышенный» при использовании в настоящем изобретении означает общее увеличение не менее чем на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или более уровня экспрессии IL-36R в тестируемом образце по сравнению с уровнем экспрессии IL-36R в референсном образце при детекции с использованием одного и того же метода. Референсный образец может представлять собой контрольный образец, полученный от здорового или не имеющего болезни индивидуума, либо здоровый или не связанный с болезнью образец, полученный от того же индивидуума, от которого получен тестируемый образец.

В некоторых воплощениях ассоциированное с IL-36R заболевание, расстройство или состояние включает без ограничения воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, респираторные заболевания, болезни обмена веществ и рак.

В определенных воплощениях воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из аллергического воспаления кожи, легких и желудочно-кишечного тракта, атопического дерматита (также известного как атопическая экзема), астмы (аллергической и неаллергической) и опосредованного эпителием воспаления. В некоторых воплощениях аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из псориаза обыкновенного (часто называемого псориазом), гнойного гидраденита, генерализованного пустулезного псориаза (ГПП), ладонно-подошвенного пустулеза (ЛПП), воспалительного заболевания кишечника, атопического дерматита и угрей обыкновенных. В некоторых воплощениях респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, муковисцидоза, эмфиземы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и острого респираторного дистресс-синдрома. В некоторых воплощениях болезнь обмена веществ выбрана из группы, состоящей из ожирения, диабета 2-го типа, атеросклероза и сердечно-сосудистого заболевания. В некоторых воплощениях рак может представлять собой любой тип рака, известный в данной области, включая без ограничения меланому, почечно-клеточную карциному, рак легких, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак гортани, рак печени, рак щитовидной железы, рак желудка, рак слюнной железы, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, лейкоз, лимфому и карциному из клеток Меркеля.

В некоторых воплощениях заболевание или расстройство выбраны из группы, состоящей из псориаза, пустулезного псориаза, гнойного гидраденита, ихтиоза, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), атопического дерматита, угрей обыкновенных и болезни Бехчета.

Терапевтически эффективное количество антитела или антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем изобретении, будет зависеть от различных факторов, известных специалистам в данной области техники, таких как, например, масса тела, возраст, анамнез перенесенных заболеваний, принимаемые в настоящее время лекарственные средства, состояние здоровья субъекта и возможность перекрестных реакций, аллергий, чувствительностей и нежелательных побочных эффектов, а также от пути введения и степени развития заболевания. Дозы могут быть пропорционально снижены или повышены специалистом в данной области техники (например, врачом или ветеринаром) в соответствии с этими и другими условиями или требованиями.

В определенных воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, можно вводить в терапевтически эффективной дозе от примерно 0,01 мг/кг до примерно 100 мг/кг. В определенных воплощениях вводимая доза может меняться в течение курса лечения. Например, в определенных воплощениях начальная вводимая доза может быть выше, чем последующие вводимые дозы. В определенных воплощениях вводимая доза может варьировать в течение курса лечения в зависимости от реакции субъекта.

Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (например терапевтического ответа). Например, может быть введена одна доза или могут быть введены несколько разделенных доз в течение определенного времени.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, могут быть введены любым путем, известным специалистам в данной области техники, таким как, например, парентеральные (например подкожный, внутривенный, внутримышечный, включая внутривенную инфузию, внутримышечную или внутривенную инъекцию) или непарентеральные (например пероральный, интраназальный, внутриглазной, подъязычный, ректальный или местный) пути.

В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, могут быть введены отдельно или в комбинации с терапевтически эффективным количеством второго терапевтического агента. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем изобретении, могут быть введены в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент может представлять собой агент, который полезен для лечения псориаза, например, ГПП (генерализованного пустулезного псориаза), ЛПП (ладонно-подошвенного пустулеза), ГГ (гнойного гидраденита), болезни Бехчета и т.п.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой иммунодепрессант на основе гормона. В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент включает глюкокортикоиды или стероиды. Неограничивающие примеры глюкокортикоидов или стероидов включают будесонид, флунизолид, триамцинолона ацетонид, флутиказона пропионат, беклометазона дипропионат и циклезонид.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой терапевтический агент или лекарственное средство для псориаза. В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент может представлять собой небиологический агент, такой как метотрексат, циклоспорин, сложные эфиры фумаровой кислоты (FAE), гидроксикарбамид, фумараты (такие как диметилфумарат), ретиноиды (синтетические формы витамина А), глюкокортикоиды или стероиды. В некоторых воплощениях второй терапевтический агент может представлять собой биологический агент, который прерывает иммунный процесс, вовлеченный в псориаз, нацеливаясь на специфические аспекты иммунной системы, участвующие в патогенезе псориаза. В некоторых воплощениях указанный биологический агент представляет собой моноклональное антитело, нацеленное на IL17, IL12/23, IL23 и/или TNF-альфа и т.д. Примеры такого моноклонального антитела включают, без ограничений, инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб, цертолизумаба пэгол, иксекизумаб, устекинумаб, гуселькумаб, эфализумаб, алефацепт, секукинумаб и бродалумаб.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой терапевтический агент или лекарственное средство для ГПП (генерализованного пустулезного псориаза). В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент включает терапевтический агент или лекарственное средство, такое как глюкокортикоид или стероид, этанерцепт, ПУВА, гидроксимочевина, дапсон, циклоспорин А, адалимумаб, этретинат, изотретиноин или ацитретин.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой терапевтический агент или лекарственное средство для ЛПП (ладонно-подошвенного пустулеза). В некоторых воплощениях второй терапевтический агент включает терапевтический агент или лекарственное средство, такое как ретиноид, циклоспорин,

тетрациклин, колхицин, *Tripterygium wilfordii*, *Tripterygium hypoglaucum* Hutch, моноклональное антитело к интерлейкину 23 (такое как гуселькумаб).

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой терапевтический агент или лекарственное средство для ГГ (гнойного гидраденита). В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент включает терапевтический агент или лекарственное средство, такое как кортикостероид, антибиотик, антиандрогенный агент, противовоспалительный агент. Примеры антибиотиков включают, без ограничений, рифампицин, клиндамицин, тетрациклин и миноциклин. Примеры антиандрогенного агента включают без ограничения спиронолактон, флутамид, ципротерона ацетат, этинилэстрадиол, финастерид, дутастерид и метформин. Примеры противовоспалительного агента включают, без ограничений, ингибитор TNF, такой как инфликсимаб, этанерцепт и адалимумаб.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой терапевтический агент или лекарственное средство для болезни Бехчета. В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент включает терапевтический агент или лекарственное средство, такое как местные лекарственные средства, кортикостероиды, метотрексат, колхицин, талидомид, азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, микофенолата мофетил и антагонисты фактора некроза опухоли. Примеры антагонистов фактора некроза опухоли включают без ограничения инфликсимаб, этанерцепт и апремиласт.

В некоторых воплощениях указанный второй терапевтический агент представляет собой лекарственное средство, нацеленное на IL-17, IL-23, TNF, IL-12, IL-1 и т. д.

В некоторых из этих воплощений антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, которые вводят в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, могут быть введены одновременно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, а в некоторых из этих воплощений антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и дополнительный(ые) терапевтический(ие) агент(ы) могут быть введены как часть одной и той же фармацевтической композиции. Однако антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводимые «в комбинации» с другим терапевтическим агентом, не обязательно должны быть введены одновременно с указанным агентом или в той же композиции, что и указанный агент. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводимые до или после другого агента, считаются вводимыми «в комбинации» с указанным агентом при использовании этой фразы в настоящем изобретении, даже если указанные антитело или

антигенсвязывающий фрагмент и второй агент вводят разными путями. Насколько возможно, дополнительные терапевтические агенты, вводимые в комбинации с антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, предложенными в настоящем изобретении, вводят в соответствии со схемой, приведенной в информационном листке продукта для дополнительного терапевтического агента, либо в соответствии с Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002)) или протоколами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к способам модуляции активности IL-36R в IL-36R-положительных клетках, включающим воздействие на IL-36R-положительные клетки антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам детекции присутствия или количества IL-36R в образце, включающим приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенными в настоящем изобретении, и определение присутствия или количества IL-36R в указанном образце.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики ассоциированного с IL-36R заболевания, расстройства или состояния у субъекта, включающему а) приведение образца, полученного от указанного субъекта, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенными в настоящем изобретении; б) определение присутствия или количества IL-36R в указанном образце; и с) установление корреляции между присутствием или количеством IL-36R и наличием или статусом ассоциированного с IL-36R заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к наборам, содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, возможно конъюгированные с детектируемым фрагментом, который полезен для детекции ассоциированного с IL-36R заболевания, расстройства или состояния. Указанные наборы могут дополнительно содержать инструкции по применению.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем изобретении, в изготовлении лекарственного средства для лечения, предупреждения или ослабления ассоциированного с IL-36R заболевания, расстройства или состояния у субъекта, в изготовлении диагностического реагента для диагностики ассоциированного с IL-36R заболевания, расстройства или состояния.

Следующие далее примеры приведены для того, чтобы лучше проиллюстрировать заявленное изобретение и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Все специфические композиции, материалы и способы, описанные ниже, полностью или частично, входят в объем настоящего изобретения. Эти специфические композиции, материалы и способы не предназначены для ограничения изобретения, а просто иллюстрируют конкретные примеры воплощения, входящие в объем изобретения. Специалист в данной области техники может разработать эквивалентные композиции, материалы и способы, не проявляя изобретательскую способность и не отступая от объема изобретения. Понятно, что в описанные здесь методики могут быть внесены многие изменения, которые будут оставаться в пределах объема настоящего изобретения. Авторы изобретения полагают, что такие изменения включены в объем изобретения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Получение антител

1.1 Иммунизация и скрининг антител

Мышей различных линий (C57BL/6, BALB/c, SJL и CD-1) иммунизировали рекомбинантным человеческим белком IL-36R-his (внеклеточный домен, с 1-го по 337-й аминокислотный остаток в SEQ ID NO: 211). Тех животных, у которых развился ответ с высоким титром, отобрали для выделения одиночных В-клеток. В-клетки из селезенки и лимфатических узлов выделяли и обогащали с помощью микрогранул. В-клетки, которые распознавали hIL-36R, окрашивали и выделяли с помощью FACS. Последовательности тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов этих В-клеток клонировали и экспрессировали рекомбинантными методами. Затем эти моноклональные антитела подвергали повторному скринингу на связывание с hIL-36R и блокирование передачи сигнала. Последовательности переменных областей отобранных антител к IL-36R перечислены в Таблицах 1 и 2 настоящего описания.

1.2 Экспрессия эталонных антител

В качестве эталонных использовали антитела к IL-36R: BI655130, ANB019 и REGN14. Последовательности эталонных антител взяты из патентов: US10550189, US20200017592A1, US10526410B2 или из информационной системы IMGT (код 10845). Кодированные последовательности ДНК синтезировали и клонировали в вектор pcDNA3.1 с получением экспрессионных плазмид для антител. Экспрессионные плазмиды трансфицировали в клетки CHO-s с помощью экспрессионной системы ExpiCHO™ (Gibco, A29133). Через 14 суток собирали супернатанты и антитела очищали аффинной хроматографией на колонке с белком А.

Вариабельные последовательности эталонных антител перечислены ниже:

VH в BI655130 (SEQ ID NO: 205):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWMGEINPGNVR
TNYNENFRNKVTMTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCTVVFYGEFYPYWGQGTLV
TVSS

VL в BI655130 (SEQ ID NO: 206):

QIVLTQSPGTLSPGERATMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGQAPRLWIYRTSRLASGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDAATYYCHQFHRSP LTFGAGTKLEIK

VH в ANB019 (SEQ ID NO: 207):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYWMNWVRQAPRQGLEWMGMFHPTG
DVTRLNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARTTSMPIGGFAYWGQG
TLVTVSS

VL в ANB019 (SEQ ID NO: 208):

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSL LHRNAITYFYWYLHKPGQPPQLLIYQMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGGTKVEIK

VH в REGN14 (SEQ ID NO: 209):

EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSVISWNSDVI
AYSDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRTE DTALYYCTKGHKWSFFDYWGQGTLVT
VSS

VL в REGN14 (SEQ ID NO: 210):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIFNVANRATDIPAR
FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQR SNWPLTFGGGGTKVEIK

ПРИМЕР 2. Испытание на связывание с IL-36R методом биослойной интерферометрии (BLI)

Антитела, выявленные в Примере 1, разбавляли буфером для изучения кинетики (PBS, pH 7,4, 0,1% BSA + 0,01% Твин-20) до концентрации 100 нМ. Рекомбинантный белок hIL-36R (Acrobio, кат. № IL2-H52H6) разбавляли буфером для изучения кинетики с получением серии растворов с градиентом концентраций: 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ и 0 нМ в качестве контроля в референсной лунке. Антитела иммобилизовали на биосенсоре с белком А после уравнивания. Детекцию базовой линии проводили в течение 60 секунд. Затем детектировали ассоциацию антитело-антиген в течение 180 секунд с получением данных по фактору K_{on} . Далее проводили диссоциацию в буфере для изучения кинетики в течение 180 секунд с получением данных по фактору K_{off} . Регенерацию

биосенсоров осуществляли в буфере 10 мМ глицин, рН 2,0. Все кинетические данные собирали при 30°C. Данные получали с помощью системы Gator Bioanalysis.

Как показано на Фиг. 1 и в Таблице 6, химерные антитела 5F7 и 9А6 связываются с hIL-36R со значением K_D $1,46 \times 10^{-8}$ М и $2,05 \times 10^{-11}$ М, соответственно.

Таблица 6. Аффинность связывания антител к IL-36R

Клон	k_{on} (1/с)	k_{off} (1/М·с)	K_D (М)
5F7	$5,91 \times 10^4$	0,000861	$1,46 \times 10^{-8}$
9А6	$3,97 \times 10^4$	$8,14 \times 10^{-7}$	$2,05 \times 10^{-11}$
9С12	0,000795	$7,94 \times 10^4$	$1,00 \times 10^{-8}$
10D12	0,000321	$7,98 \times 10^4$	$4,03 \times 10^{-9}$
10F6	0,000137	$1,52 \times 10^5$	$9,01 \times 10^{-10}$
9Н11	$5,79 \times 10^{-07}$	$9,17 \times 10^4$	$6,31 \times 10^{-12}$
1С11	0,000872	$6,38 \times 10^4$	$1,37 \times 10^{-8}$
1А21	$4,01 \times 10^{-5}$	$7,49 \times 10^4$	$5,36 \times 10^{-10}$
1J3	$4,37 \times 10^{-5}$	$7,32 \times 10^4$	$5,97 \times 10^{-10}$
1J22	0,000747	$6,80 \times 10^4$	$1,10 \times 10^{-8}$

Клетки репортерной клеточной линии Jurkat-IL36R-IL1Racp-NFkB-luc использовали для оценки блокирующей активности антител к IL-36R из Таблицы 1.

Как показано на Фиг. 18, 5F7 и 9А6 демонстрируют самую высокую блокирующую активность среди всех антител к IL-36R из Таблицы 1.

ПРИМЕР 3. Оценка блокирующей активности методом репортерного анализа IL-36R

Клетки репортерной клеточной линии Jurkat-IL36R-IL1Racp-NFkB-luc использовали для оценки блокирующей активности антител к IL-36R. Клетки Jurkat-IL36R-IL1Racp-NFkB-luc собирали и высевали в белый 96-луночный планшет при концентрации 50000 клеток/25 мкл на лунку. Добавляли по 50 мкл серийных разведений антител, перемешивали с клетками и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем добавляли по 25 мкг/лунка лигандов 2 нг/мл IL-36 α и перемешивали с клетками, потом инкубировали при 37°C в течение 4,5 ч. После этого добавляли в планшет по 50 мкл/лунка реагента One-Glu и считывали люминесцентный сигнал с помощью Tecan Spark.

Как показано на Фиг. 2, химерные антитела 5F7 и 9А6 блокировали индуцированную лигандом IL-36 α передачу сигнала через IL-36R с IC_{50} 0,4477 нМ и 0,3123 нМ, соответственно.

ПРИМЕР 4. Гуманизация антител

Для гуманизации был выбран клон антител 5F7. Сначала с помощью IgBLAST от NCBI выбрали наиболее подходящие человеческие каркасные области для переноса CDR грызунов. Использовали переменные области с высокой идентичностью аминокислотных последовательностей относительно переменных областей грызунов (гомологичное совпадение или наиболее подходящие). Далее гуманизировали мАТ 5F7 путем пересадки трех CDR из переменной области легкой цепи в человеческую VL, которая была насколько возможно гомологична VL мышинового антитела. Аналогично три его CDR из переменной области тяжелой цепи переносили в человеческую VH, которая была насколько возможно гомологична мышинному антителу. Дополнительно, в каркасной области выбранных человеческих переменных областей несколько аминокислотных остатков заменили на аминокислотные остатки, которые присутствовали в мышинных переменных областях (так называемые обратные мутации). Гуманизированные последовательности 5F7 перечислены в Таблицах 3–5 в настоящем описании. Активность гуманизованного 5F7 оценивали методами BLI и репортерного анализа IL-36R. Экспериментальные методики были такими же, как описано в Примерах 2 и 3.

Как показано в Таблице 7 и на Фиг. 3, связывающая и блокирующая активность исходной молекулы 5F7 была воспроизведена после гуманизации.

Таблица 7. Аффинность связывания гуманизованного 5F7

Антитело	k_{off} (1/с)	k_{on} (1/М·с)	K_D (М)
5F7-hu-2	0,000233	$3,40 \times 10^4$	$6,86 \times 10^{-9}$
5F7-hu-3	0,000194	$4,27 \times 10^4$	$4,55 \times 10^{-9}$
5F7-hu-5	0,000294	$4,67 \times 10^4$	$6,28 \times 10^{-9}$

ПРИМЕР 5. Созревание аффинности антител

Чтобы усилить аффинность связывания гуманизованных антител 5F7, для созревания аффинности использовали комбинацию рандомизации по методу «прогулки по CDR1» и подхода, основанного на рациональном дизайне. Сначала вносили мутации в CDR-H1 и CDR-L1 с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами, в которой используют олигонуклеотиды, содержащие кодон NNK в сайтах мутации, и перед отбором проводили секвенирование ДНК для подтверждения того, что клоны из библиотеки не содержали отклонений. Далее независимо три раза выполняли эксперименты по отбору при различных концентрациях растворимого IL-36R-his: 2 мкг/мл, 1 мкг/мл и 0,5 мкг/мл. После трех раундов отбора анализировали аминокислотные последовательности клонов, случайно

выбранных после последнего раунда, затем были получены обогащенные клоны из эксперимента с концентрацией растворимого IL-36R-his 0,5 мкг/мл. Далее одну легкую цепь и 7 тяжелых цепей вышеуказанных обогащенных клонов клонировали в вектор pCDNA3.1+ с последовательностью константной области из hIgG4 и экспрессировали в клетках CHO. При этом константная область тяжелой цепи содержала мутацию S228P. Последовательности переменных областей этих клонов перечислены в Таблице 4 настоящего описания. Связывающую и блокирующую активность этих клонов оценивали с помощью системы Gator Bioanalysis и репортерного анализа IL-36R.

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 203):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи (SEQ ID NO: 202):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Как показано в Таблице 8 и на Фиг. 4, были успешно выделены мутанты 5F7 с повышенной аффинностью. И блокирующая активность 5F7 также была повышена после созревания.

Таблица 8. Аффинность связывания 5F7 после созревания (по результатам испытания BLI)

Клон	k_{on} (1/М·с)	k_{off} (1/с)	K_D (М)
5F7-2a1	$3,25 \times 10^4$	Н/П	$< 1 \times 10^{-10}$
5F7-2a6	$3,98 \times 10^4$	Н/П	$< 1 \times 10^{-10}$
5F7-2a8	$4,71 \times 10^4$	Н/П	$< 1 \times 10^{-10}$
5F7-2c4	203	0,000418	$2,06 \times 10^{-6}$
5F7-2d3	$3,59 \times 10^4$	$8,83 \times 10^{-5}$	$2,46 \times 10^{-9}$

5F7-2g10	$2,89 \times 10^4$	$1,84 \times 10^{-5}$	$6,38 \times 10^{-10}$
5F7-2h1	$4,10 \times 10^4$	Н/П	$< 1 \times 10^{-10}$

ПРИМЕР 6. Испытание аффинности связывания методом SPR

Для оценки аффинности связывания антител к hIL-36R проводили испытания аффинности связывания антител методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с помощью Biacore T200. Анализ проводили при 25°C, а в качестве рабочего буфера выступал HBS-EP+. Разведенные антитела иммобилизовали на сенсорном чипе методом захвата через Fc. Референсные антитела BI655130, ANB019 и REGN14 получали рекомбинантными методами. Варибельная последовательность тяжелой цепи и варибельная последовательность легкой цепи указаны в SEQ ID NO: 205 и 206, соответственно, для BI655130; указаны в SEQ ID NO: 207 и 208, соответственно, для ANB019; и указаны в SEQ ID NO: 209 и 210, соответственно, для REGN14. В качестве аналита использовали hIL-36R, после которого вводили рабочий буфер в качестве фазы для диссоциации.

Как показано на Фиг. 5 и в Таблице 9, 5F7-2a8 связывается с hIL-36R со значением K_D $1,52 \times 10^{-9}$ М.

Таблица 9. Аффинность связывания антител с hIL-36R (по результатам испытания SPR)

Антитело	k_a (1/М·с)	k_d (1/с)	K_D (М)	R_{max} (RU)	χ^2 (RU ²)
5F7-2a8	$2,95 \times 10^4$	$4,48 \times 10^{-5}$	$1,52 \times 10^{-9}$	91,62	0,0256
BI655130	$3,92 \times 10^4$	$3,66 \times 10^{-5}$	$9,35 \times 10^{-10}$	81,75	0,0518
ANB019	$3,35 \times 10^4$	$4,44 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-8}$	68,13	0,178
REGN14	$7,56 \times 10^4$	$2,83 \times 10^{-4}$	$3,74 \times 10^{-9}$	93,92	0,241

ПРИМЕР 7. Испытания связывания антител с hIL36R методом ELISA

Рекомбинантный белок hIL36R иммобилизовали в концентрации 1 мкг/мл по 100 мкл на лунку в планшете для ELISA в течение ночи. После промывки проводили блокирование планшета с помощью PBS, содержащего 1% BSA + 1% нормальная козья сыворотка + 0,05% Твин-20. После этого в планшет добавляли по 100 мкл серийных разведений антител и инкубировали в течение 1 ч. Специфическое связывание антител с hIL36R детектировали с помощью пероксидазы хрена (HRP), связанной с антителом к hIgG.

Как показано на Фиг. 6, 5F7-2a8 связывается с рекомбинантным hIL-36R-his со значением EC_{50} 0,00947 мкг/мл.

ПРИМЕР 8. Связывание с мембранным IL-36R

Для оценки способности антител связываться с мембранным IL-36R на клетках различных биологических видов клетки HEK293 трансфицировали плазмидами pcDNA3.1-hIL36R, pcDNA3.1-cynoIL36R или pcDNA3.1-musIL36R с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen, кат. № 11668-019). Через 48 ч трансфицированные клетки подвергали анализу методом FACS на связывание с антителами к-IL-36R. Клетки собирали и высевали в 96-луночный планшет при концентрации 100000 клеток/50 мкл/луночка. Добавляли к клеткам по 50 мкл серийных разведений антител и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После этого клетки дважды промывали PBS, добавляли к клеткам по 100 мкл разведенного второго антитела (меченное FITC антитело к hIgG) и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. После инкубации клетки дважды промывали PBS и анализировали методом проточной цитометрии.

Как показано на Фиг. 7, 5F7-2a8 связывается с мембранным hIL-36R со значением EC_{50} 0,1462 мкг/мл. Как показано на Фиг. 8 и Фиг. 9, 5F7-2a8 не проявлял перекрестной реактивности в отношении IL-36R яванского макака или мыши.

ПРИМЕР 9. Испытание на перекрестную реактивность в отношении IL-36R яванского макака и мыши

Для испытания того, связывается ли 5F7 с рекомбинантным белком IL-36R яванского макака/мыши или нет, антитела разбавляли буфером для изучения кинетики (PBS, pH 7,4, 0,1% BSA + 0,01% Твин-20) до концентрации 100 нМ. Рекомбинантный белок IL36R яванского макака (Acrobio, кат. № IL2-C52H5) или мышинный IL-36R (R&D, кат. № 2354-RP) разбавляли буфером для изучения кинетики для получения серии растворов с градиентом концентраций: 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ и 0 нМ в качестве контроля в референсной лунке. Антитела иммобилизовали на биосенсоре с белком А после уравнивания. В качестве аналита использовали IL-36R яванского макака или мыши, после которого вводили рабочий буфер в качестве фазы для диссоциации.

Как показано в Таблице 10, 5F7-hu-3 не проявлял перекрестной реактивности в отношении IL-36R яванского макака или мыши.

Таблица 10. Перекрестная реактивность в отношении IL-36R яванского макака и мыши

Антитело	K _D (M)	
	яванский макак	мышь
5F7-hu-3	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует
BI655130	$> 1 \times 10^{-05}$ мкМ	Связывание отсутствует
REGN1412	$7,26 \times 10^{-9}$ M	Связывание отсутствует

ПРИМЕР 10. Специфичность связывания

При испытании 5F7-2a8 на специфичность связывания белок IL1R1 является для IL-36R наиболее гомологически родственным членом семейства IL-1R. Рекombинантный белок hIL1R1 использовали для испытания того, связывается ли 5F7-2a8 с IL1R1 или нет. Белок hIL1R1 иммобилизовали в концентрации 1 г/мл по 100 мкл на лунку в планшете для ELISA в течение ночи. Далее проводили блокирование планшета с помощью PBS, содержащего 1% BSA + 1% нормальная сыворотка козла + 0,05% Твин-20. После этого в планшет добавляли по 100 мкл серийных разведений антител и инкубировали в течение 1 ч. Специфическое связывание антител с hIL1R1 детектировали с помощью HRP, связанной с антителом к hIgG.

Как показано на Фиг. 10, 5F7-2a8 не обладало связывающей активностью в отношении hIL1R1.

ПРИМЕР 11. Антитело блокирует индуцированное IL-36α/β/γ высвобождение IL-8 в клетках A431

Чтобы оценить активность антитела к IL-36R по ингибированию высвобождения IL-8 в клетках A431, клетки A431 собирали и высевали в 96-луночный планшет в концентрации 50 000 клеток/50 мкл/лунка. Добавляли к клеткам по 100 мкл серийных разведений антител и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Далее добавляли в планшет по 50 мкл 300 нг/мл IL-36α, или 100 нг/мл IL-36β, или 100 нг/мл IL-36γ и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. После инкубации супернатанты переносили в 96-луночный планшет с V-образным дном и центрифугировали при 1500 g в течение 5 мин. Не содержащие клеток супернатанты осторожно собирали и хранили при -70°C в морозильной камере. Концентрацию IL-8 в супернатантах определяли с помощью набора IL-8 ELISA (DAKEWE, кат. № 1110802).

Как показано на Фиг. 11, 5F7-2a8 блокирует индуцированное IL-36α, IL-36β или IL-36γ высвобождение IL-8 в клетках A431 со значениями IC₅₀ 0,1953, 0,1109 и

0,008775 мкг/мл, соответственно. Как видно, 5F7-2a8 сильно ингибирует индуцированную IL-36 α выработку IL-8 в клетках A431. Ингибиторная активность 5F7-2a8 сопоставима с таковой у VI655130, но намного сильнее, чем у ABN019 или REGN14.

ПРИМЕР 12. Антитело блокирует индуцированное IL-36 α высвобождение IL-8 в клетках HDF

Чтобы оценить активность антитела к IL-36R по ингибированию высвобождения IL-8 в первичных человеческих фибробластах дермы (HDF), клетки HDF собирали и высевали в 96-луночный планшет в концентрации 5000 клеток/50 мкл/луночка. Добавляли в планшет по 100 мкл серийных разведений антител и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Далее добавляли к клеткам по 50 мкл 300 нг/мл IL-36 α и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. После инкубации супернатанты переносили в 96-луночный планшет с V-образным дном и центрифугировали при 1500 g в течение 5 мин. Не содержащие клеток супернатанты осторожно собирали и хранили при -70°C в морозильной камере. Концентрацию IL-8 в супернатантах определяли с помощью набора IL-8 ELISA (DAKEWE, кат. № 1110802).

Как показано на Фиг. 12, 5F7-2a8 блокирует индуцированное IL-36 α высвобождение IL-8 в клетках HDF со значением IC₅₀ 0,006958 мкг/мл. Как видно, 5F7-2a8 сильно ингибирует индуцированную IL-36 α выработку IL-8 в клетках HDF. Ингибиторная активность 5F7-2a8 сопоставима с таковой у VI655130, но намного сильнее, чем у ABN019 или REGN14.

ПРИМЕР 13. Антитело блокирует индуцированное IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$ высвобождение IL-8/IL-6/TNF α в клетках НЕК

Чтобы оценить активность антитела к IL-36R по ингибированию высвобождения IL-8 в первичных человеческих эпителиальных кератиноцитах (НЕК), проводили процедуру стимуляции и блокирования клеток НЕК, как описано в Примере 11. Концентрации IL-8, IL-6 и TNF α определяли с помощью набора Multi-Analyte Flow Assay (Biolegend) согласно инструкции производителя.

Как показано на Фиг. 13, 5F7-2a8 блокирует индуцированное IL-36 α высвобождение IL-8/IL-6/TNF α в клетках НЕК со значениями IC₅₀ 0,1293, 0,1098 и 0,05352 мкг/мл, соответственно. Как показано на Фиг. 15, 5F7-2a8 блокирует индуцированное IL-36 β высвобождение IL-8/IL-6/TNF α в клетках НЕК со значениями IC₅₀ 0,04805, 0,01885 и 0,02346 мкг/мл, соответственно. Как показано на Фиг. 16, 5F7-2a8 блокирует индуцированное IL-36 γ высвобождение IL-8/IL-6/TNF α в клетках НЕК со значениями IC₅₀ 0,03264, 0,04458 и 0,005258 мкг/мл, соответственно.

Как видно, 5F7-2a8 сильно ингибирует индуцированную IL-36($\alpha/\beta/\gamma$) выработку IL-8, IL-6 и TNF α в клетках НЕК. Ингибиторная активность 5F7-2a8 сопоставима с таковой у BI655130, но намного сильнее, чем у ABN019 или REGN14.

ПРИМЕР 14. Мутации в Fc для продления периода полувыведения антитела

Для продления периода полувыведения 5F7-2a8 вводили в домен Fc из IgG4 мутации, которые усиливают связывание антитела с FcRn. Мутации M252Y/S254T/T256E (YTE) вводили в молекулу 5F7-2a8-YTE, а мутации T307Q/N434A (QA) вводили в молекулу 5F7-2a8-QA. Последовательность константной области тяжелой цепи в 5F7-2a8-WT с Fc дикого типа была такой, как показано в SEQ ID NO: 203. Константная область тяжелой цепи в 5F7-2a8-YTE была такой, как показано в SEQ ID NO: 201. Константная область тяжелой цепи в 5F7-2a8-QA была такой, как показано в SEQ ID NO: 204.

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи в 5F7-2a8-YTE (SEQ ID NO: 201):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи в 5F7-2a8-QA (SEQ ID NO: 204):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLQVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHANHYTQKSLSLGLGK.

Последовательность константной области легкой цепи в 5F7-2a8-WT, 5F7-2a8-YTE и 5F7-2a8-QA идентична последовательности SEQ ID NO: 202. Аффинность связывания антител с hFcRn оценивали с помощью аналитической системы Gator Bioanalysis. Вкратце, рекомбинантный гетеродимерный белок hFcRn-his/B2M (Acrobio, кат. № FCM-H82W4) загружали на биосенсор, захватывающий His, в качестве анализа использовали серийные разведения антител. Ассоциацию и диссоциацию проводили в буфере KD с pH 6,0.

Как показано на Фиг. 16 и в Таблице 11, аффинности связывания 5F7-2a8-YTE и 5F7-2a8-QA были повышены примерно в 10 раз по сравнению с таковой у 5F7-2a8-WT.

Таблица 11. Аффинность связывания антител с hFcRn

	k_{off} (1/с)	k_{on} (1/М·с)	K_D (М)
5F7-WT	0,0507	$3,01 \times 10^5$	$1,68 \times 10^{-7}$
5F7-YTE	0,00277	$1,80 \times 10^5$	$1,54 \times 10^{-8}$
5F7-QA	0,00398	$2,90 \times 10^5$	$1,37 \times 10^{-8}$

ПРИМЕР 15. ФК-анализ 5F7-2a8-YTE и 5F7-2a8-QA

Чтобы оценить фармакокинетику 5F7-2a8-YTE и 5F7-2a8-QA у яванских макаков и hFcRn-трансгенных мышей, для ФК-испытания у яванских макаков 2 животным (1 самец и 1 самка) в каждой группе вводили однократную дозу, т.е. проводили инфузию при дозе 5 мг/кг. Сыворотку собирали в следующих временных точках после введения лекарственного средства: 0 ч, 0,5 ч, 2 ч, 8 ч, 24 ч, 48 ч, 3 сут, 4 сут, 7 сут, 14 сут, 21 сут, 28 сут, 35 сут, 42 сут, 49 сут. Концентрации антител в сыворотке определяли методом ELISA. Вкратце, рекомбинантный белок hIL36R иммобилизовали при концентрации 1 мкг/мл, по 100 мкл на лунку в планшете для ELISA в течение ночи. После промывки проводили блокирование планшета с помощью PBS, содержащего 1% BSA + 1% нормальная козья сыворотка + 0,05% Твин-20. После этого в планшет добавляли по 100 мкл соответствующих разведений сыворотки или определенные концентрации антител и инкубировали в течение 1 ч. Далее проводили детекцию связывания антител с помощью HRP, связанной с антителом к hIgG. Концентрации лекарственных средств в сыворотке рассчитывали с помощью стандартной кривой, построенной по данным образцов с определенными концентрациями.

Как показано на Фиг. 17, в Таблице 12 и Таблице 13, период полувыведения 5F7-2a8-YTE и 5F7-2a8-QA у яванских макаков был значимо продлен по сравнению с таковым эталонного антитела с Fc без усиления связывания с FcRn.

Таблица 12. Результаты ФК-испытания у яванских макаков

ФК-параметр	единица	5F7-YTE			5F7-QA			BI655130		
		Яв. мак. 1	Яв. мак. 2	Среднее	Яв. мак. 1	Яв. мак. 2	Среднее	Яв. мак. 1	Яв. мак. 2	Среднее
$t_{1/2}$	ч	1114,534	684,215	754,876	623,478	885,760	787,077	273,261	104,728	187,786
T_{max}	ч	0,5	0	0	0	2	2	0,5	2	0,5

C_{\max}	мкг/мл	44,584	52,428	46,513	77,444	88,024	74,625	46,302	57,364	48,641
AUC_{0-t}	мкг/мл×ч	11813,450	10669,839	11241,644	15385,166	16535,243	15960,204	7542,024	3183,386	5879,557
$AUC_{0-inf_набл.}$	мкг/мл×ч	28388,416	16963,178	20326,408	28466,653	35736,380	32 748,187	8627,248	5042,706	6252,442
$MRT_{0-inf_набл.}$	ч	1577,719	876,614	1048,786	984,435	1303,732	1183,625	378,998	158,061	250,799
$Cl_{набл.}$	мл/сут./кг	4,227	7,074	5,904	4,215	3,358	3,664	13,909	23,797	19,193
$V_{ss_набл.}$	мл/кг	277,881	258,387	257,986	172,910	182,410	180,716	219,652	156,723	200,561

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к IL-36R или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, где

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность $DYYX_1X_2$ (SEQ ID NO: 191), SEQ ID NO: 19, 33, 48, 64, 79, 94, 109, 124 или 139;

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность $LIRNKAAGYTIYYX_3X_4X_5VKG$ (SEQ ID NO: 192), SEQ ID NO: 20, 34, 49, 65, 80, 95, 110, 125 или 140; и

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 21, 35, 50, 66, 81, 96, 111, 126 или 141;

где X_1 представляет собой M или L; X_2 представляет собой N, H, S или R; X_3 представляет собой S или A; X_4 представляет собой A или D; X_5 представляет собой S или P.

2. Антитело к IL-36R или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, где

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность $RASX_{18}NINIWLS$ (SEQ ID NO: 193), SEQ ID NO: 22, 36, 51, 67, 82, 97, 112, 127 или 142;

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 23, 37, 52, 68, 83, 98, 113, 128 или 113; и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность $X_{19}QSQSYPLT$ (SEQ ID NO: 194), SEQ ID NO: 24, 38, 53, 69, 84, 99, 114, 129 или 143;

где X_{18} представляет собой Q или R; X_{19} представляет собой Q или L.

3. Антитело к IL-36R или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 и/или определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, где

(a) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность $DYYX_1X_2$ (SEQ ID NO: 191),

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность $LIRNKAAGYTIYYX_3X_4X_5VKG$ (SEQ ID NO: 192),

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5,

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASX₁₈NINIWLS (SEQ ID NO: 193),

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность X₁₉QSQSYPLT (SEQ ID NO: 194),

где X₁ представляет собой M или L; X₂ представляет собой N, H, S или R; X₃ представляет собой S или A; X₄ представляет собой A или D; X₅ представляет собой S или P; X₁₈ представляет собой Q или R; X₁₉ представляет собой Q или L;

(b) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19,

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20,

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22,

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;

(c) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33,

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34,

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35,

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36,

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38;

(d) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48,

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49,

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50,

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51,

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53;

(e) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64,

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65,

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66,

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67,

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69;

(f) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79,

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80,

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81,
LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82,
LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, и
LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84;
(g) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94,
HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95,
HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96,
LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97,
LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и
LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;
(h) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109,
HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110,
HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111,
LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112,
LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, и
LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114;
(i) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124,
HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125,
HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126,
LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127,
LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, и
LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129; или
(j) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139,
HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140,
HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141,
LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142,
LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, и
LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 180, 184 или
188,

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 151, 164 или
173,

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5,

последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153;

(g) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153;

(h) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 184; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153;

(i) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153;

(j) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 188; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153; или

(k) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, дополнительно содержащие одну или более каркасных областей тяжелой цепи 1 (HFR1), HFR2, HFR3 и

HFR4 и/или одну или более каркасных областей легкой цепи 1 (LFR1), LFR2, LFR3 и LFR4, где

(a) HFR1 содержит аминокислотную последовательность X₆VQLX₇ESGGGLVKPGGSLRLSCAASGX₈X₉FX₁₀ (SEQ ID NO: 195) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности,

HFR2 содержит аминокислотную последовательность WX₁₁RQAPGKGGLEWVX₁₂ (SEQ ID NO: 196) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности,

HFR3 содержит аминокислотную последовательность RFTISRDX₁₃X₁₄KSX₁₅LYLQMNSLX₁₆X₁₇EDTAVYYCVR (SEQ ID NO: 197) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности,

HFR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157 или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности,

LFR1 содержит аминокислотную последовательность X₂₀IVMTQSPX₂₁X₂₂X₂₃SX₂₄SX₂₅GX₂₆RX₂₇TX₂₈X₂₉C (SEQ ID NO: 198) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности,

LFR2 содержит аминокислотную последовательность WYQQKPGX₃₀APX₃₁LFIY (SEQ ID NO: 199) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности,

LFR3 содержит аминокислотную последовательность GVPX₃₂RFSGSGSGTX₃₃FTLTISSLQX₃₄EDFAX₃₅YYC (SEQ ID NO: 200) или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, и

LFR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161 или гомологичную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности,

где X₆ представляет собой Q или E; X₇ представляет собой Q или V; X₈ представляет собой F или Y; X₉ представляет собой A, D или N; X₁₀ представляет собой T или G; X₁₁ представляет собой I или V; X₁₂ представляет собой S или A; X₁₃ представляет собой N или D; X₁₄ представляет собой A или S; X₁₅ представляет собой S или T; X₁₆ представляет собой R или K; X₁₇ представляет собой A или T; X₂₀ представляет собой D или E; X₂₁ представляет собой S или A; X₂₂ представляет собой S или T; X₂₃ представляет собой L или V; X₂₄

представляет собой A или V; X₂₅ представляет собой V или P; X₂₆ представляет собой D или E; X₂₇ представляет собой V или A; X₂₈ представляет собой I или L; X₂₉ представляет собой T или S, X₃₀ представляет собой Q или K; X₃₁ представляет собой K или R; X₃₂ представляет собой S или A; X₃₃ представляет собой D или E; X₃₄ представляет собой S или P; X₃₅ представляет собой T или V.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–6, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 17, 31, 46, 62, 77, 92, 107, 122, 137, 149, 162, 171, 176, 179, 182, 183, 185, 187 и 189 или гомологичной им последовательности с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–7, содержащие переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 32, 47, 63, 78, 93, 108, 123, 138, 150, 163, 172 и 177 или гомологичной им последовательности с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–8, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 149, 162, 171, 176, 179, 182, 183, 185, 187 и 189 или гомологичной им последовательности с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–7, содержащие переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 150, 163, 172 и 177 или гомологичной им последовательности.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–10, дополнительно содержащие одну или более замен или модификаций аминокислотных остатков, сохраняя при этом специфичность связывания с человеческим IL-36R.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, где по меньшей мере одна из замен или модификаций расположена в одной или более последовательностях определяющей комплементарность области (CDR) переменной области тяжелой цепи или переменной области легкой цепи.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, где по меньшей мере одна из замен или модификаций расположена в одной или более последовательностях,

не являющихся CDR, вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–13, дополнительно содержащие область Fc, возможно область Fc человеческого иммуноглобулина (Ig) или возможно область Fc человеческого IgG.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 14, где область Fc происходит из человеческого IgG4.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, где область Fc, происходящая из человеческого IgG4, содержит мутации M252Y/S254T/T256 (YTE) или T307Q/N434A (QA).

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, содержащие константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 203 и 204.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 16, содержащие константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–18, которые являются гуманизированными.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–19, которые представляют собой моноклональное антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, рекомбинантное антитело, химерное антитело, меченое антитело, бивалентное антитело, антиидиотипическое антитело или слитый белок.

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–20, которые представляют собой диатело, фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, стабилизированный дисульфидной связью фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидной связью диатело (ds-диатело), молекулу одноцепочечного антитела (scFv), димер scFv (бивалентное диатело), мультиспецифическое антитело, камелизированное однодоменное антитело, наноантитело, доменное антитело или бивалентное доменное антитело.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–21, которые не связываются с IL-36R яванского макака или мышинным IL-36R.

23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–22, которые не связываются с человеческим IL-1R1.

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–23, имеющие одно или более связывающих свойств в отношении человеческого IL-36R, выбранных из группы, состоящей из:

а) наличия аффинности связывания с рекомбинантным человеческим белком IL-36R с K_d не более 2×10^{-8} М (предпочтительно не более 1×10^{-8} М, например не более 9×10^{-9} М, 8×10^{-9} М, 7×10^{-9} М, 6×10^{-9} М, 5×10^{-9} М, 4×10^{-9} М, 3×10^{-9} М, 2×10^{-9} М или 1×10^{-10} М) по данным измерения методом биослойной интерферометрии (BLI);

б) наличия аффинности связывания с рекомбинантным человеческим белком IL-36R с K_d не более 1×10^{-8} М (например не более 9×10^{-9} М, 8×10^{-9} М, 7×10^{-9} М, 6×10^{-9} М, 5×10^{-9} М, 4×10^{-9} М, 3×10^{-9} М, 2×10^{-9} М или 1×10^{-10} М) по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR);

в) наличия аффинности связывания с рекомбинантным человеческим белком IL-36R с EC_{50} не более 0,1 мкг/мл (например 0,09 мкг/мл, 0,08 мкг/мл, 0,07 мкг/мл, 0,06 мкг/мл, 0,05 мкг/мл, 0,04 мкг/мл, 0,03 мкг/мл, 0,02 мкг/мл, 0,01 мкг/мл или 0,005 мкг/мл) по результатам измерения методом твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA); или

г) наличия аффинности связывания с мембранным человеческим IL-36R с EC_{50} не более 0,5 мкг/мл (например 0,4 мкг/мл, 0,3 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,19 мкг/мл, 0,18 мкг/мл, 0,17 мкг/мл, 0,16 мкг/мл, 0,15 мкг/мл или 0,1 мкг/мл) по результатам измерения методом флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS).

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–24, способные блокировать передачу сигнала через IL-36R, индуцированную агонистом IL-36R (предпочтительно IL-36 α), по результатам измерения методом репортерного анализа IL-36R.

26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–25, способные ингибировать индуцируемое агонистом IL-36R высвобождение IL-8 в клетке, где агонист IL-36R включает IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ .

27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–26, обладающие способностью ингибировать индуцируемое агонистом IL-36R высвобождение IL-6 в клетке, где агонист IL-36R включает IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ .

28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–27, обладающие способностью ингибировать индуцируемое агонистом IL-36R высвобождение TNF α в клетке, где агонист IL-36R включает IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ .

29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–28, которые связаны с одним или более конъюгированными группировками.

30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 29, где конъюгированная группировка включает агент для детекции или выделения, такой как модифицирующий элиминацию агент, люминесцентная метка, флуоресцентная метка, фермент-субстратная метка или группировка для очистки.

31. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–30.

32. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по п. 31.

33. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 32.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(1) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–30, или полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–30, или рекомбинантную иммунную клетку по п. 35 или 36; и

(2) один или более фармацевтически приемлемых носителей.

35. Фармацевтическая композиция по п. 34, дополнительно содержащая дополнительный терапевтический агент.

36. Фармацевтическая композиция по п. 35, где дополнительный терапевтический агент представляет собой агент для лечения заболевания или расстройства, реагирующего на ингибирование IL-36R.

37. Способ экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–30, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 33 в условиях, при которых экспрессируется вектор по п. 32.

38. Способ лечения, предупреждения или ослабления заболевания или расстройства, реагирующего на ингибирование IL-36R, у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–30, или полинуклеотида, кодирующего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–30, и/или фармацевтической композиции по любому из пп. 34–36.

39. Способ по п. 38, где указанное заболевание или расстройство ассоциировано с нарушением регуляции IL-36R-опосредованной передачи сигнала.

40. Способ по п. 39, где указанное нарушение регуляции IL-36R-опосредованной передачи сигнала включает нарушение регуляции IL-36 (IL-36 α , IL-36 β или IL-36 γ), агониста IL-36R и/или IL-38.

41. Способ по п. 39 или 40, где указанное нарушение регуляции IL-36R-опосредованной передачи сигнала включает избыточную активацию IL-36 (IL-36 α , IL-36 β или IL-36 γ) или избыточное подавление агониста IL-36R и IL-38 по сравнению с контрольным уровнем.

42. Способ по п. 41, где контрольный уровень представляет собой уровень у здорового субъекта.

43. Способ по п. 38, где заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из: воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, респираторного заболевания, болезни обмена веществ и рака.

44. Способ по п. 43, где воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из: аллергического воспаления кожи, легких и желудочно-кишечного тракта, атопического дерматита (также известного как атопическая экзема), астмы (аллергической и неаллергической), опосредованного эпителием воспаления, фиброза (например идиопатического легочного фиброза, склеродермии, фиброза почек и рубцевания), аллергического ринита, видов пищевой аллергии (например аллергии на арахис, яйца, молочные продукты, морепродукты, лесные орехи и т.д.), видов сезонной аллергии и других видов аллергии.

45. Способ по п. 44, где воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из: аллергического воспаления кожи, легких и желудочно-кишечного тракта, атопического дерматита (также известного как атопическая экзема), астмы (аллергической и неаллергической) и опосредованного эпителием воспаления.

46. Способ по п. 43, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из: рассеянного склероза, астмы, сахарного диабета 1-го типа, ревматоидного артрита, склеродермии, болезни Крона, псориаза обыкновенного (часто называемого псориазом), гнойного гидраденита, генерализованного пустулезного псориаза (ГПП), ладонно-подошвенного пустулеза (ЛПП), воспалительного заболевания кишечника, псориатического артрита, системной красной волчанки (СКВ), язвенного колита, анкилозирующего спондилита, атопического дерматита, угрей обыкновенных и болезни Бехчета.

47. Способ по п. 46, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из: псориаза обыкновенного (часто называемого псориазом), гнойного гидраденита, генерализованного пустулезного псориаза (ГПП), ладонно-подошвенного пустулеза (ЛПП), воспалительного заболевания кишечника, атопического дерматита, угрей обыкновенных и болезни Бехчета.

48. Способ по п. 43, где респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из: астмы, муковисцидоза, эмфиземы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и острого респираторного дистресс-синдрома.

49. Способ по п. 43, где болезнь обмена веществ выбрана из группы, состоящей из: ожирения, диабета 2-го типа, атеросклероза и сердечно-сосудистого заболевания.

50. Способ по п. 43, где рак может представлять собой любой тип рака, известный в данной области, включая без ограничения меланому, почечно-клеточную карциному, рак легких, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак гортани, рак печени, рак щитовидной железы, рак желудка, рак слюнной железы, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, лейкоз, лимфому и карциному из клеток Меркеля.

51. Способ по п. 38, где заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из: псориаза, пустулезного псориаза, гнойного гидраденита, ихтиоза, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), атопического дерматита, угрей обыкновенных и болезни Бехчета.

52. Способ по любому из пп. 38–51, где субъект является человеком.

53. Способ по любому из пп. 38–52, где введение представляет собой пероральное, назальное, внутривенное, подкожное, подъязычное или внутримышечное введение.

54. Способ определения присутствия или количества IL-36R в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1–30 и определение присутствия или количества IL-36R в образце.

55. Способ по п. 54, дополнительно включающий стадию определения того, является ли IL-36R сверхэкспрессированным в клетках в образце.

56. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–30 и/или фармацевтической композиции по любому из пп. 34–36 в изготовлении лекарственного средства для лечения, предупреждения или ослабления заболевания или расстройства, реагирующего на ингибирование IL-36R.

57. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен TCR, где антигенсвязывающий домен специфически связывается с IL-36R и содержит антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–30.

58. CAR по п. 57, дополнительно содержащий костимулирующий домен.

59. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR) по п. 57 или 58.

60. Клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты по п. 59.

61. Клетка, генетически модифицированная для экспрессии CAR по п. 57 или 58.

62. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по п. 59.

63. Способ стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа на экспрессирующие IL-36R клетки или ткани у млекопитающего, включающий введение указанному млекопитающему эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии CAR по п. 57 или 58.

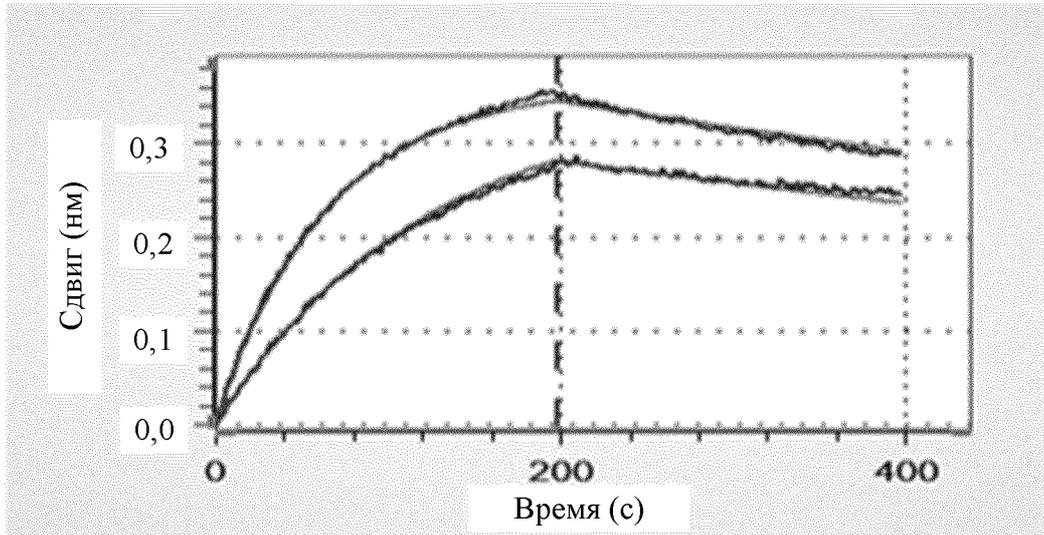
64. Способ лечения млекопитающего, имеющего ассоциированное с IL-36R заболевание или состояние, включающий введение указанному млекопитающему эффективного количества клетки по п. 61, посредством чего осуществляется лечение указанного млекопитающего.

65. Способ по п. 64, где указанная клетка является аутологичной Т-клеткой.

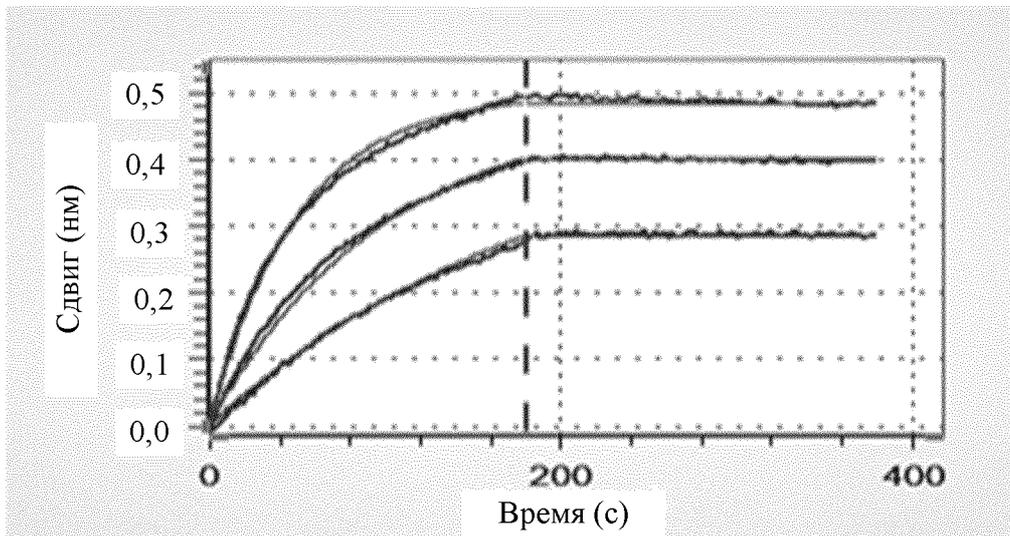
66. Способ по п. 64, где млекопитающее является субъектом-человеком.

67. Способ по п. 64, где указанное млекопитающее идентифицировано как имеющее IL-36R-положительную клетку или клетку с повышенной передачей сигнала через IL-36R.

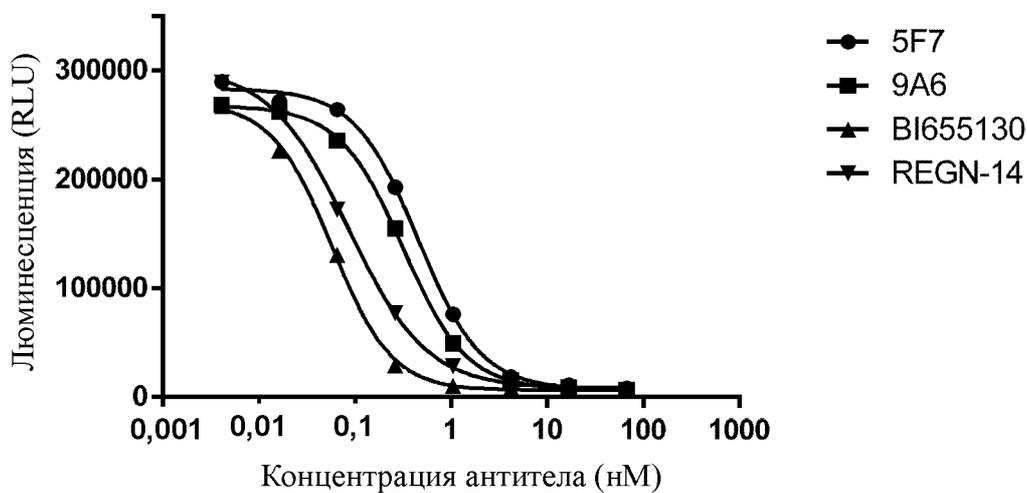
5F7



9A6

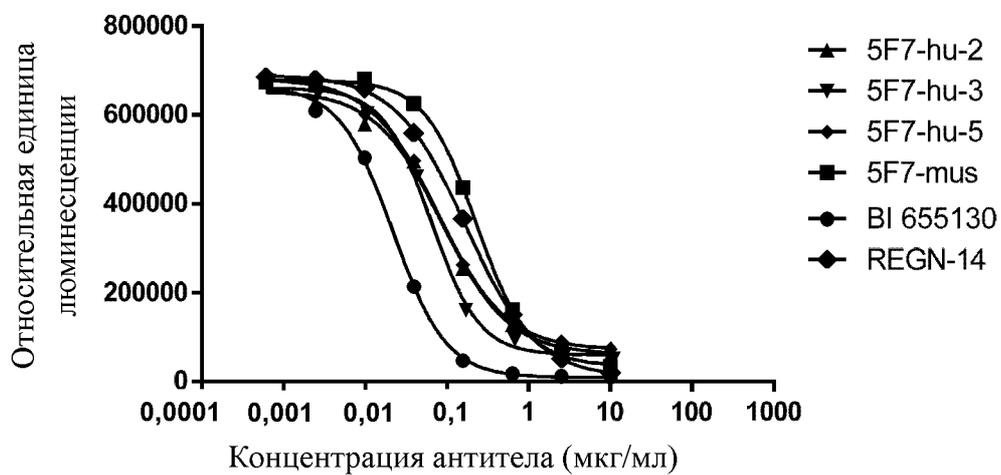


Фиг. 1



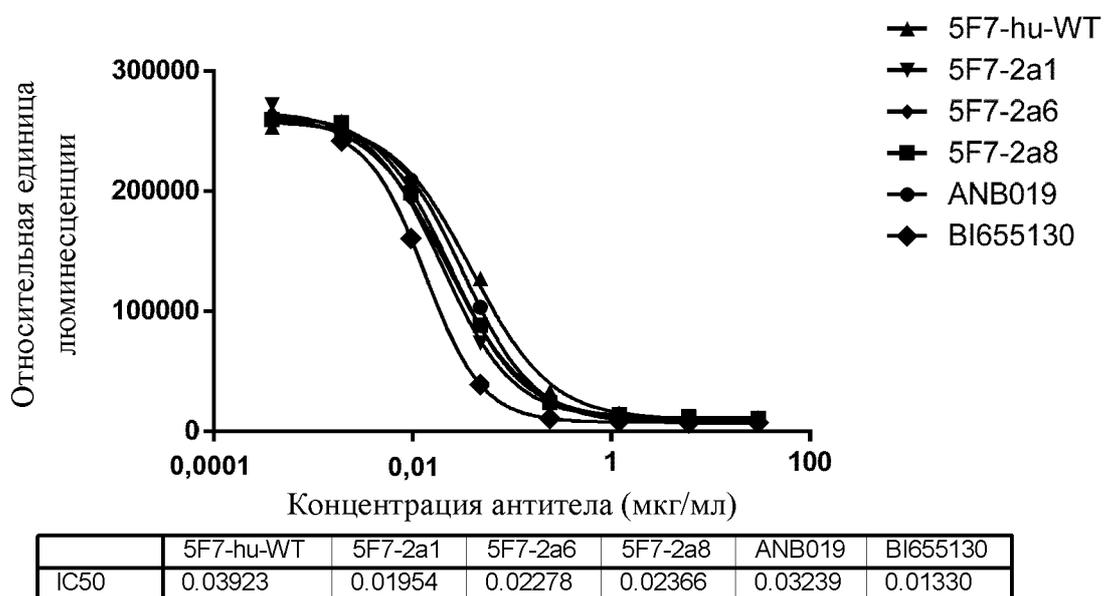
	5F7	9A6	BI655130	REGN-14
IC50	0.4477	0.3123	0.05703	0.08392

Фиг. 2

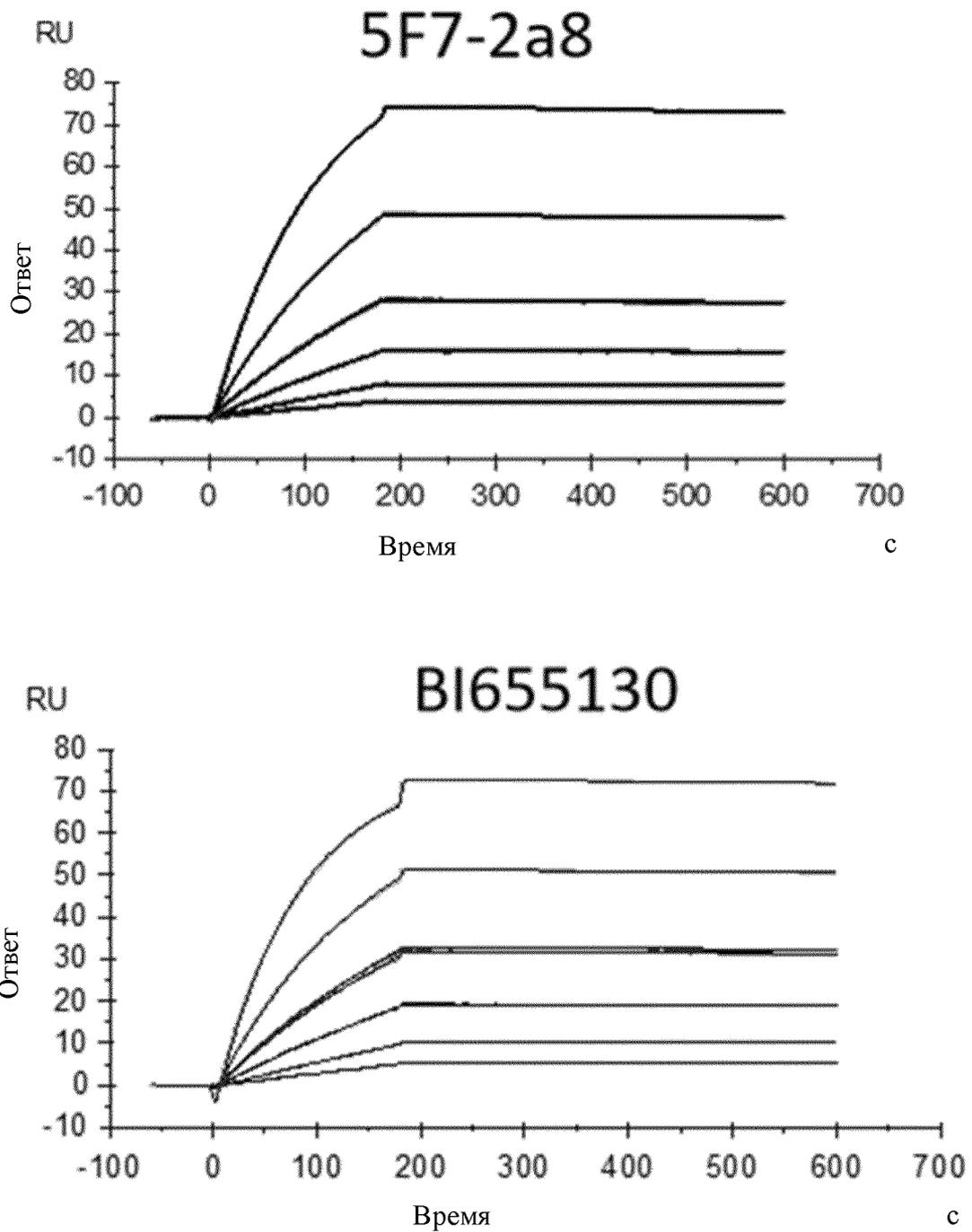


	5F7-hu-2	5F7-hu-3	5F7-hu-5	5F7-mus	BI 655130	REGN-14
IC50	0.08598	0.06369	0.07815	0.2261	0.02169	0.1693

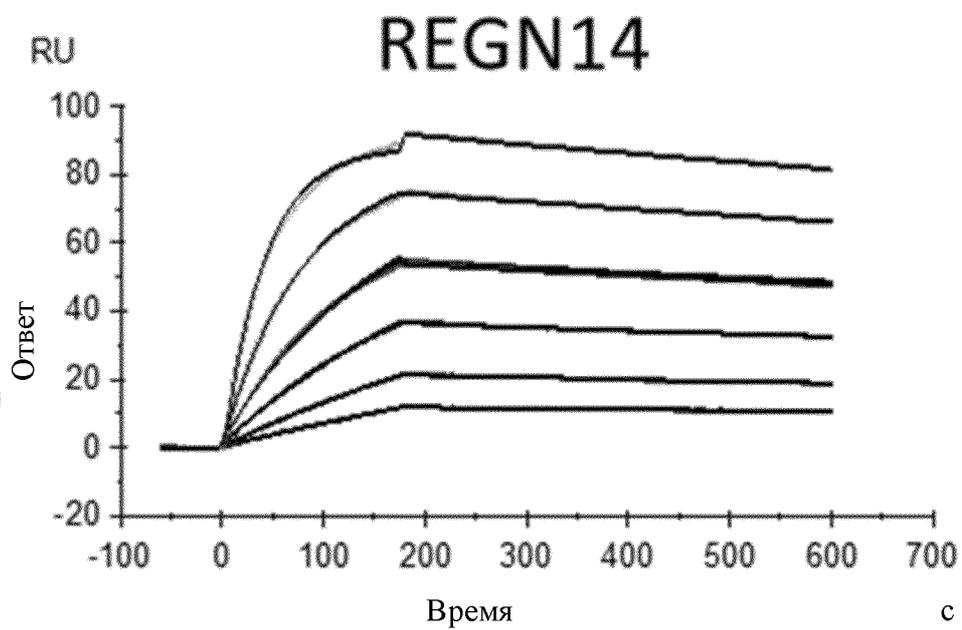
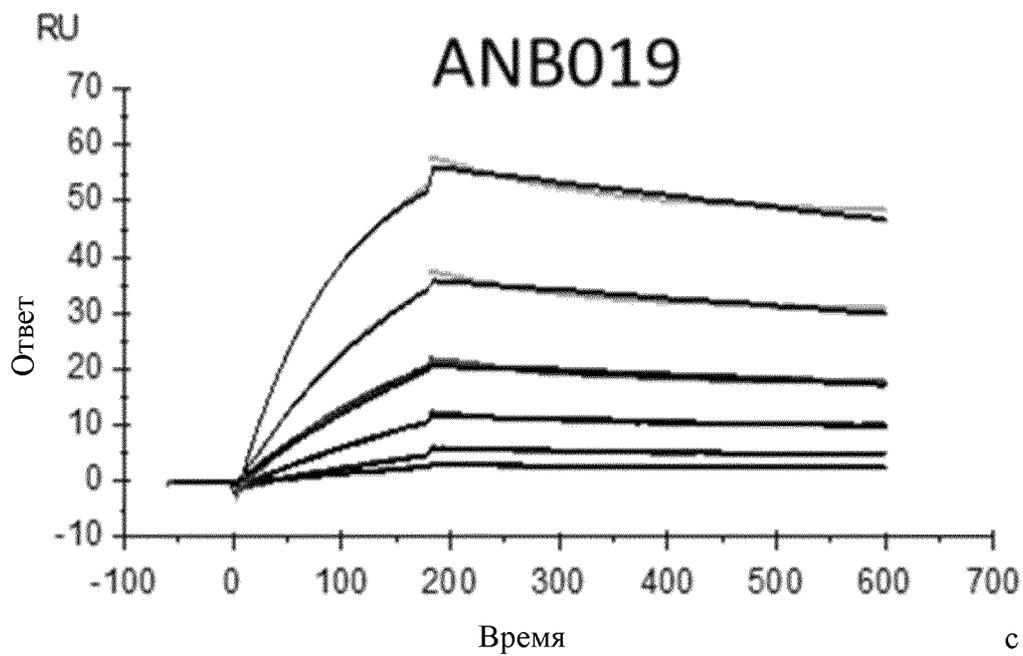
Фиг. 3



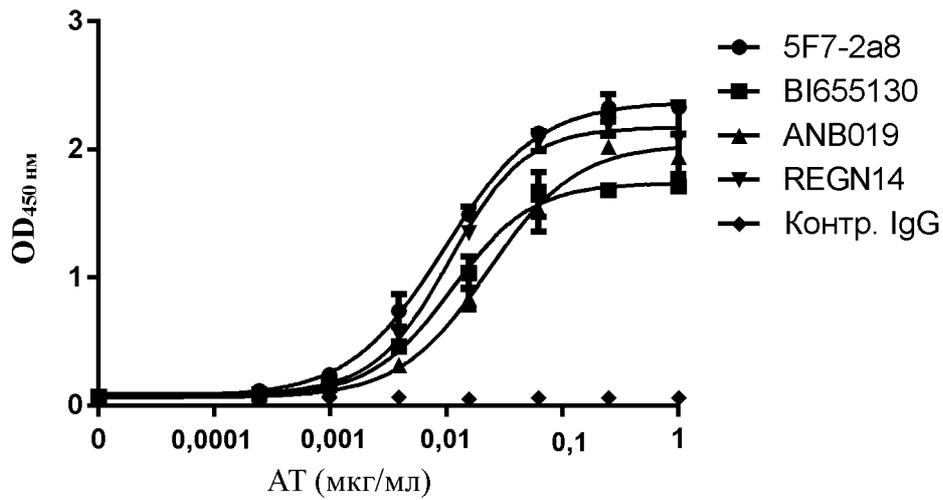
Фиг. 4



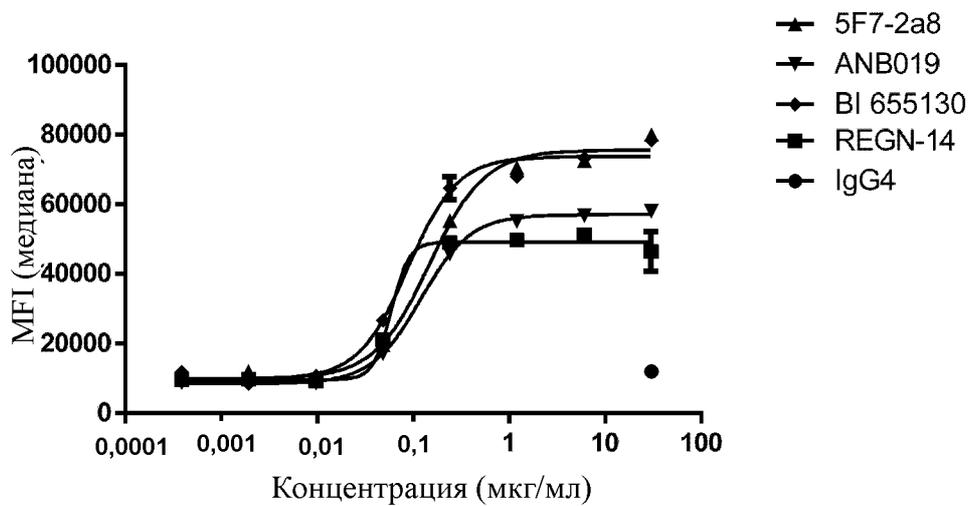
Фиг. 5



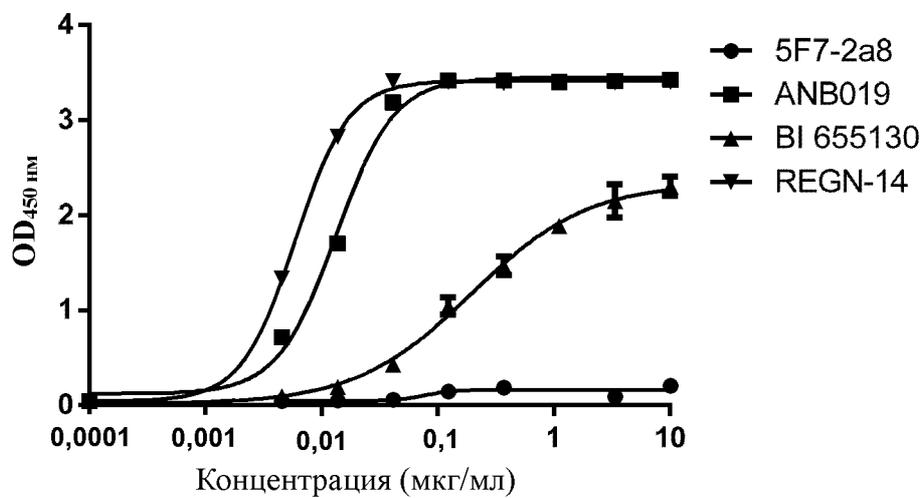
Фиг. 5 (продолж.)



Фиг. 6

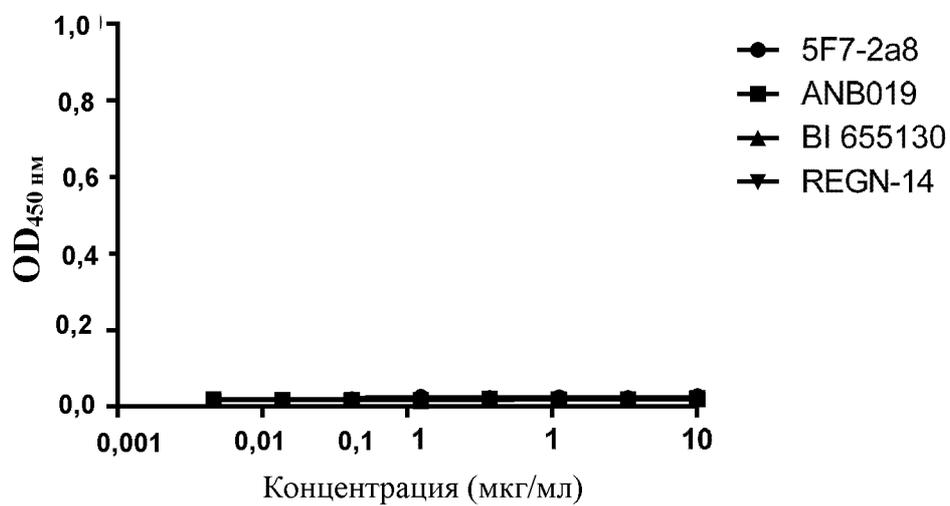


Фиг. 7

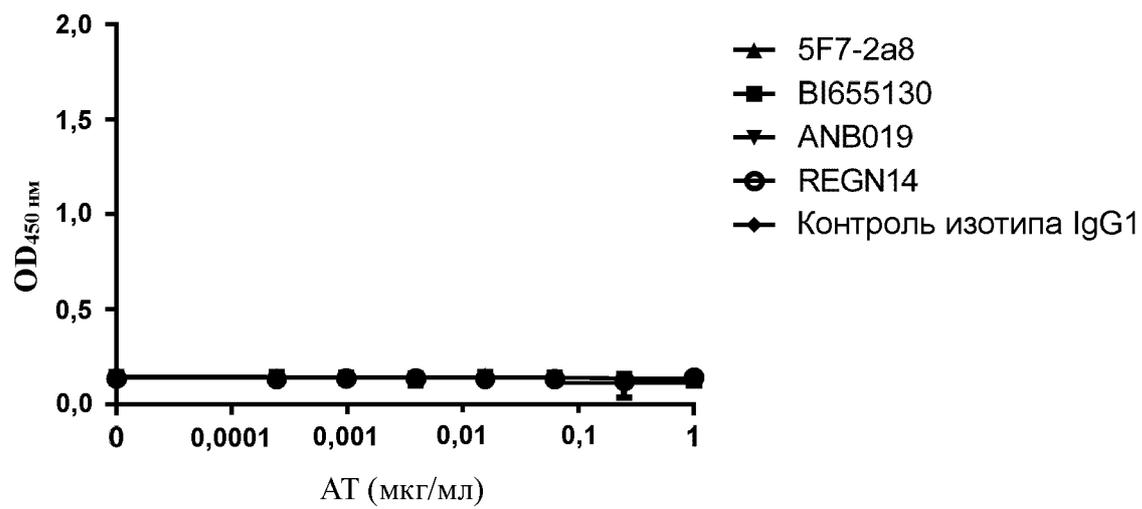


	5F7-2A8	ANB019	BI 655130	REGN-14
EC50	0.07712	0.01324	0.1960	0.005899

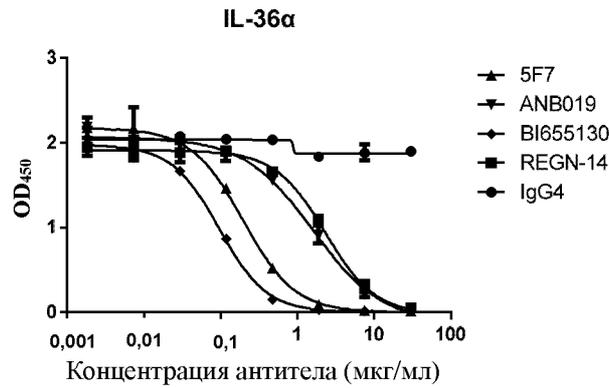
Фиг. 8



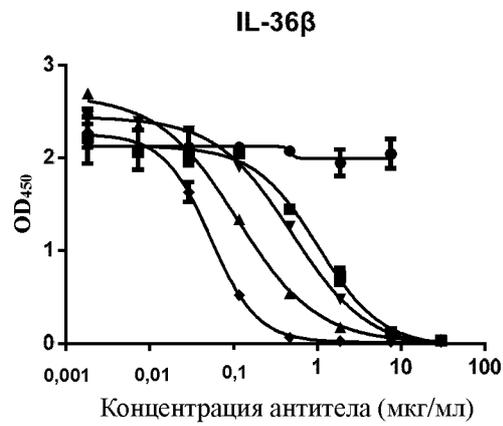
Фиг. 9



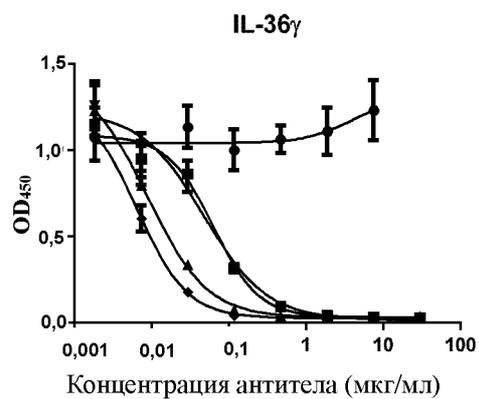
Фиг. 10



	5F7	ANB019	BI655130	REGN-14
IC50	0.1953	1.585	0.09546	2.292

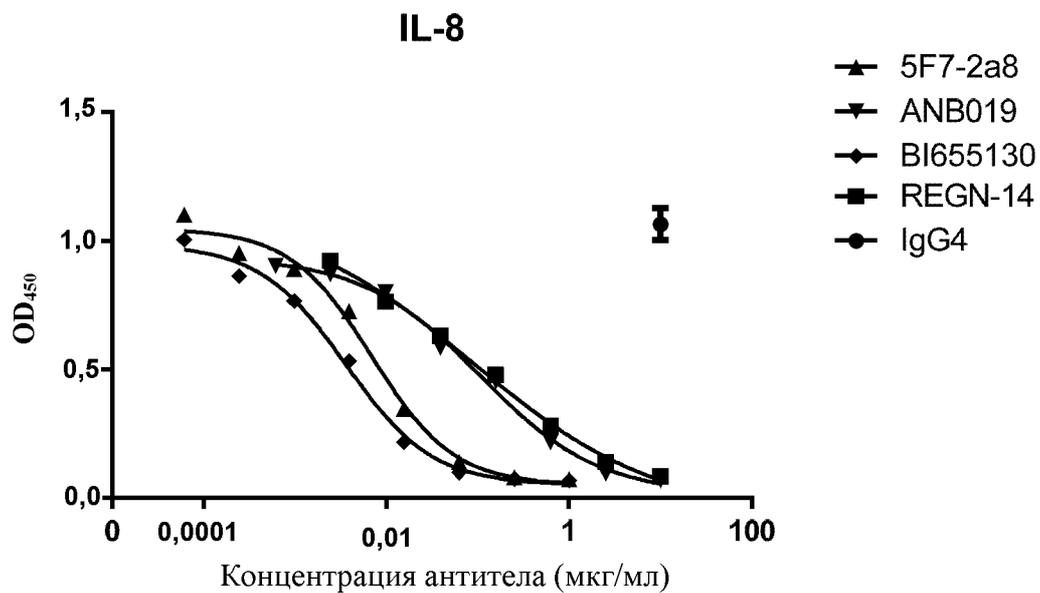


	5F7	ANB019	BI655130	REGN-14
IC50	0.1109	0.4965	0.05318	1.017



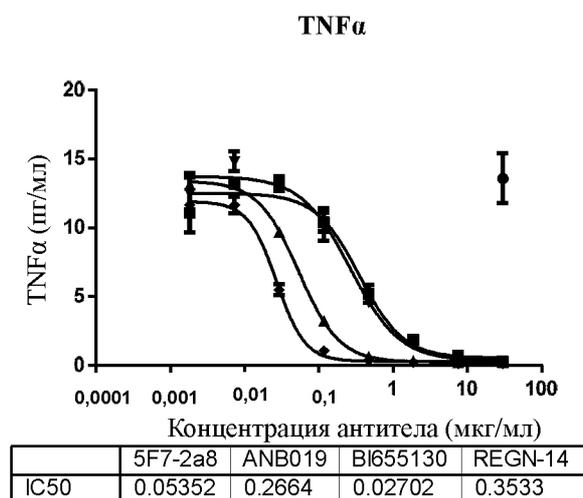
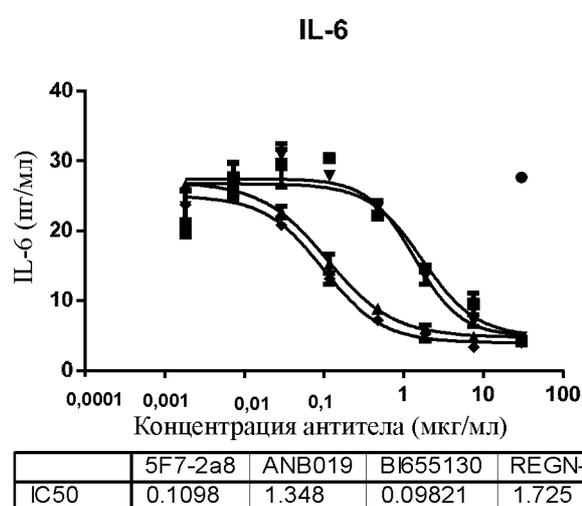
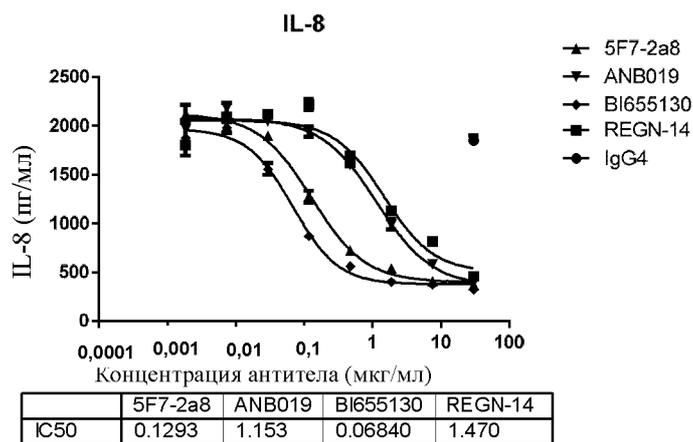
	5F7	ANB019	BI655130	REGN-14
IC50	0.008775	0.04736	0.006496	0.06273

Фиг. 11

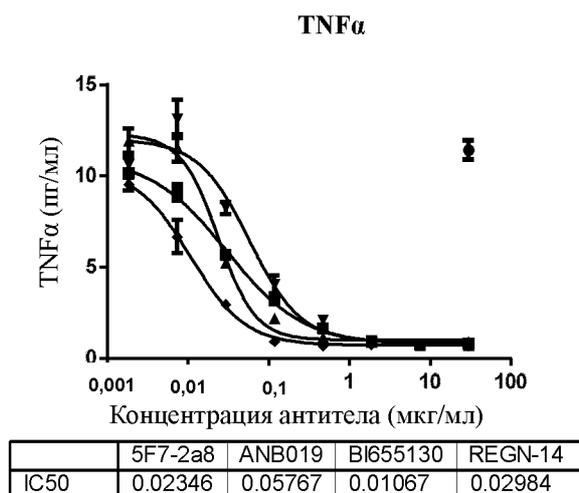
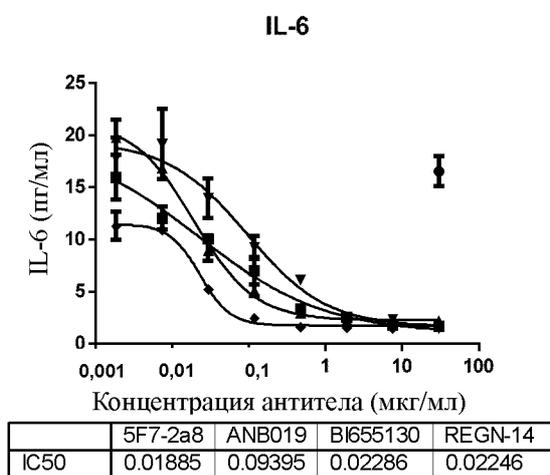
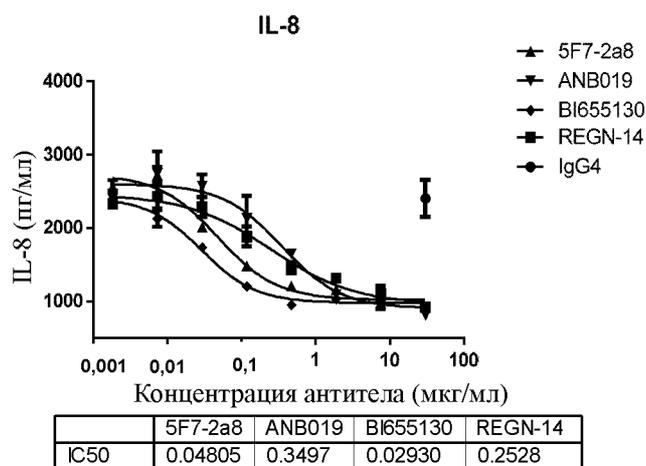


	5F7-2a8	ANB019	BI655130	REGN-14
IC ₅₀	0.006958	0.1065	0.003614	0.08768

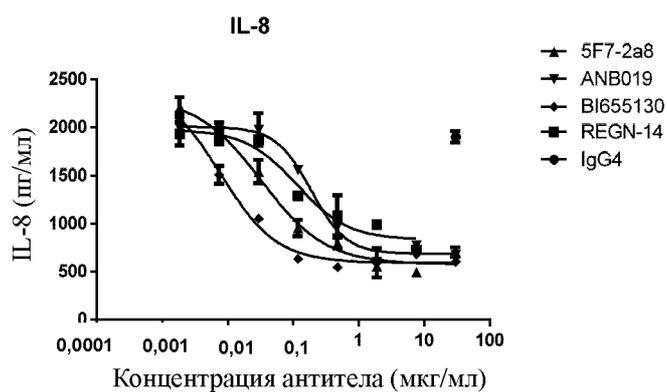
Фиг. 12



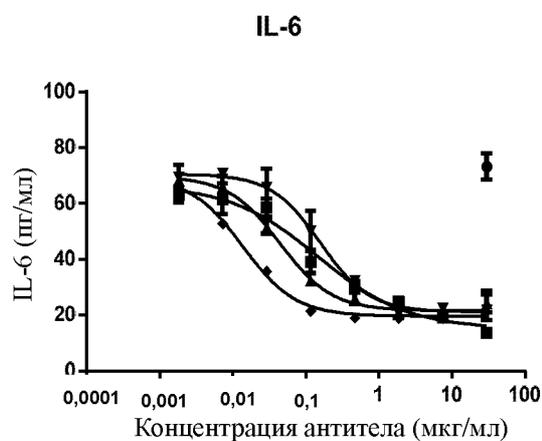
Фиг. 13



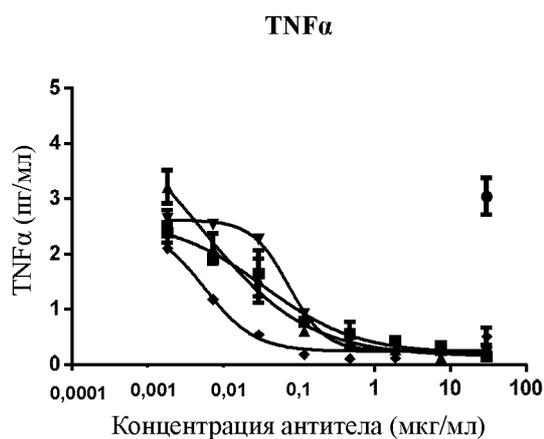
Фиг. 14



	5F7-2a8	ANB019	BI655130	REGN-14
IC50	0.03264	0.1872	0.007701	0.1137

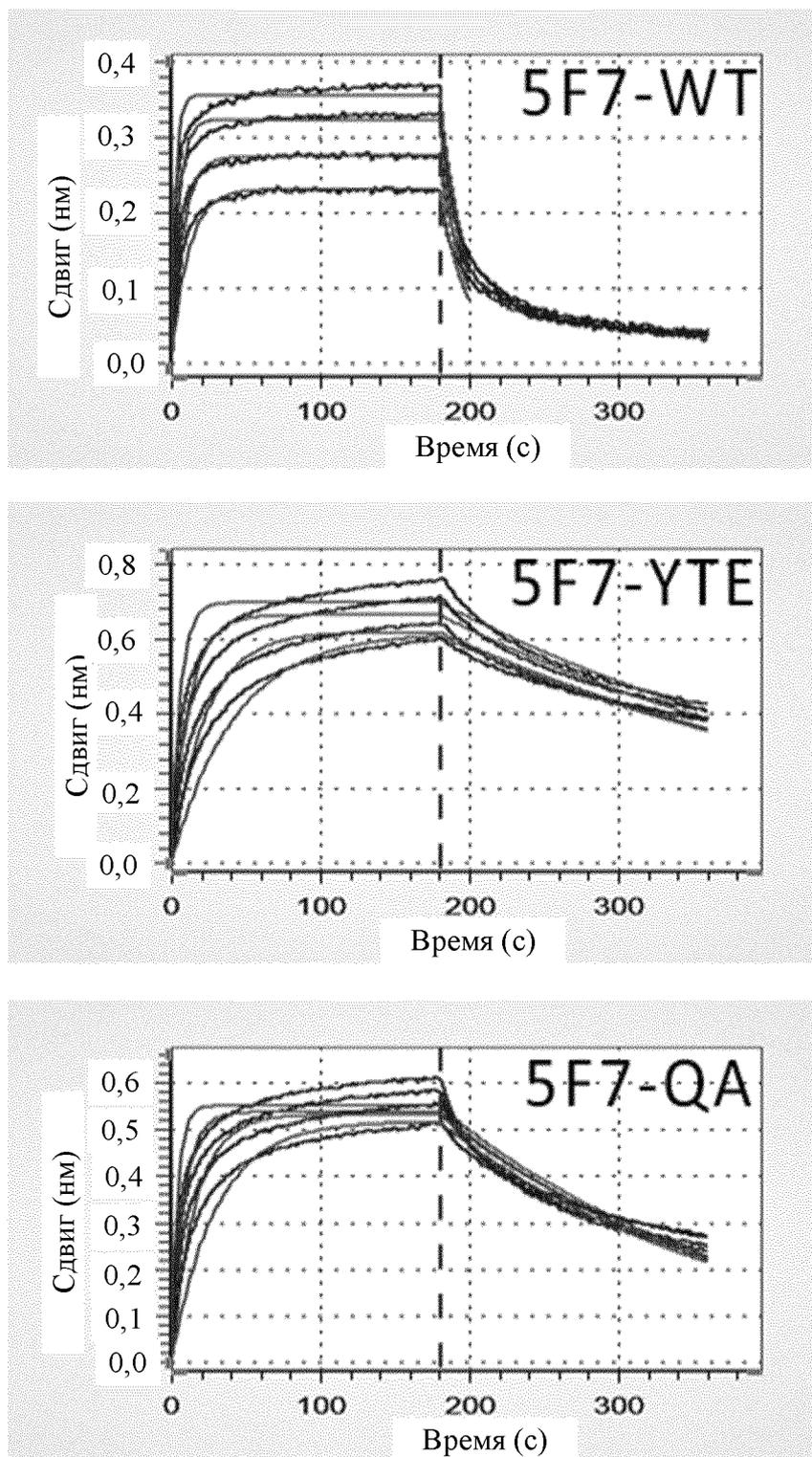


	5F7-2a8	ANB019	BI655130	REGN-14
IC50	0.04458	0.1591	0.01379	0.1481

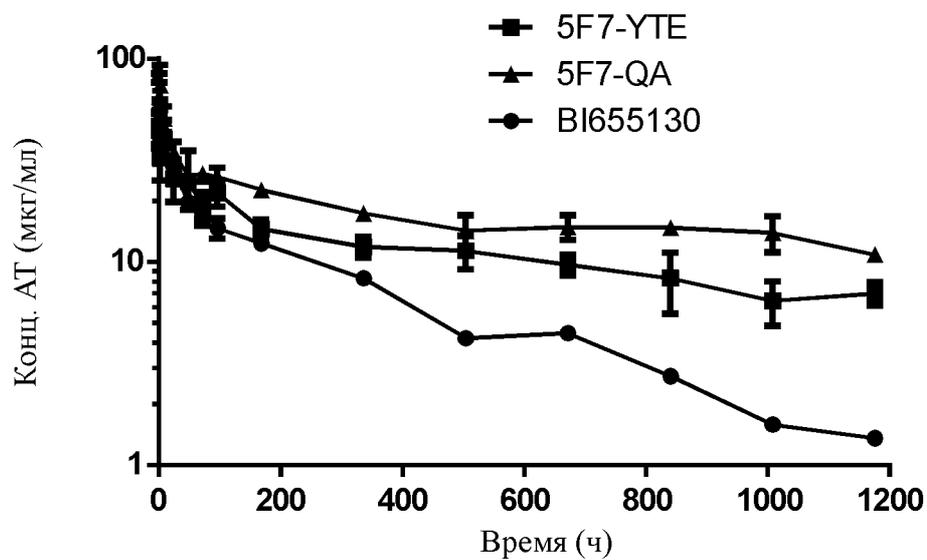


	5F7-2a8	ANB019	BI655130	REGN-14
IC50	0.005258	0.07264	0.005745	0.03465

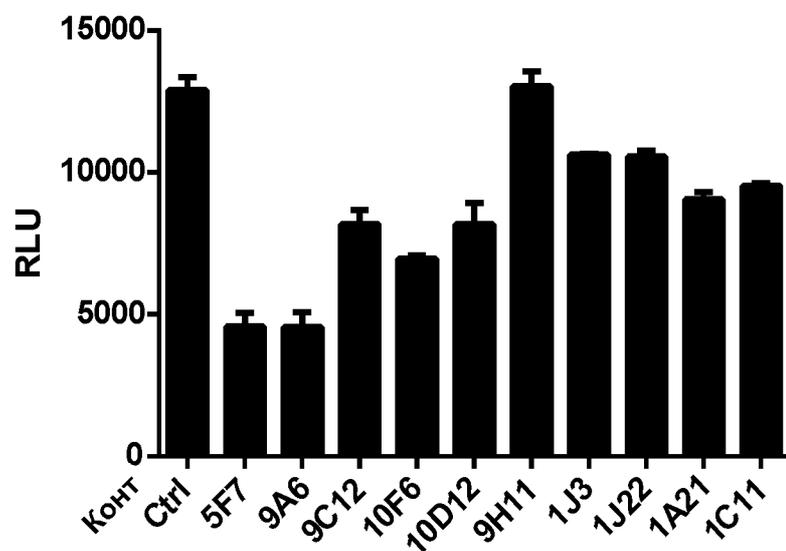
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18