(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291264 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.22

(22) Дата подачи заявки
2020.11.16

(51) Int. Cl. ***C07K 16/00*** (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К TMEM219 И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **19209521.4; 20167459.5**
(32) **2019.11.15; 2020.04.01**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2020/082292**
(87) **WO 2021/094620 2021.05.20**

(71) Заявитель:
ЭНТЕРА С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:
Фиорина Паоло, Амабиле Джованни, Д'Аддио Франческа (IT)

(74) Представитель:
Нагорных И.М. (RU)

(57) Изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с рецептором IGFBP3, а именно TMEM219, к способам их получения, фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела, и их применению.

202291264 A1

202291264 A1

АНТИТЕЛА TMEM219 И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с рецептором IGFBP3, а именно TMEM219, к способам их получения, фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела, и их применению.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ось IGFBP3/TMEM219

Белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста, представляют собой семейство из семи связывающих белков, которые модулируют биодоступность инсулиноподобных факторов роста (IGF). Среди них, IGFBP3 является наиболее распространенным, присутствует почти во всех тканях и имеет более высокое сродство к IGF; действительно, примерно 80–90% IGF связаны с IGFBP3 в тройном комплексе с кислотолабильной субъединицей (ALS) (1).

В дополнение к его способности регулировать доступность IGF, также было показано, что IGFBP3 имеет IGF-независимые функции (2). Действительно, он способен связываться с белками клеточной поверхности, рецепторами клеточной поверхности с интегральной сигнальной способностью, внутриклеточными и ядерными белками (факторами транскрипции), таким образом влияя на рост клеток и непосредственно индуцируя апоптоз (2). Среди рецепторов смерти, TMEM219, мембранный белок, пронизывающий мембрану один раз, показал высокую степень связывания с IGFBP-3 (3). Связывание IGFBP3 с TMEM219 индуцирует опосредованный каспазой-8 апоптоз в различных клетках, включая раковые клетки (т.е. предстательной железы и молочной железы) (3), а также стволовые клетки (т.е. стволовые клетки толстой кишки) (4). Было показано, что блокирование или усиление оси IGFBP3/TMEM219 с помощью различных стратегий соответственно предотвращает или увеличивает гибель клеток. Насколько нам известно, нет коммерчески доступных моноклональных антител против TMEM219 или IGFBP3, способных предотвращать связывание IGFBP3/TMEM219 и останавливать IGF-

I-независимое и опосредованное каспазой8 вредное воздействие на ткани/клетки-мишени связывания IGFBP3 с TMEM219.

Ось IGFBP3/TMEM219 при диабете

Диабет типа 1 (T1D) и диабет типа 2 (T2D) характеризуются потерей бета-клеток, что приводит к снижению секреции инсулина, неспособности контролировать уровень глюкозы в крови и гипергликемии (5,6). Несмотря на различные этиологические механизмы, либо аутоиммунный ответ при T1D, либо инсулинорезистентность/воспаление при T2D, оба приводят к прогрессирующему снижению массы бета-клеток. Действительно, становится очевидным, что происходящей аутоиммунной активации недостаточно, чтобы полностью объяснить потерю бета-клеток при T1D (5). Более того, неспособность иммунотерапии вылечить T1D (7) подчеркнута тем, что: (i) аутоиммунитет может быть не единственным фактором, участвующим в патогенезе T1D, и (ii) необходимы альтернативные стратегии, таргетирующие другие механизмы заболевания, такие как потеря бета-клеток, для создания эффективного лечения T1D. Наблюдение, что рассеянные бета-клетки обнаруживаются у индивидуумов с длительно текущим T1D (8), подтверждает, что либо должны появляться новые бета-клетки, чтобы сохранить оборот бета-клеток (5,9), либо разрушенные бета-клетки могут быть «разные» и склонны к смерти (10). Это может свидетельствовать о том, что повышающая/понижающая экспрессия поверхностных рецепторов бета-клеток может играть ключевую роль в том, чтобы сделать их видимыми для иммунной системы, и, что более важно, что другие не иммунологические детерминанты могут модулировать судьбу и функцию бета-клеток. Таким образом, предотвращение не иммунологического разрушения бета-клеток при T1D и прогрессирующей потери бета-клеток при T2D может сместить баланс между образованием и разрушением бета-клеток в сторону восстановления соответствующей массы бета-клеток, тем самым открывая путь для новых терапевтических подходов, способных остановить или отсрочить самую первую фазу заболевания.

Было показано, что TMEM219, рецептор IGFBP3, экспрессируется в линии бета-клеток и в островках человека/мыши, и что его лигирование токсично для бета-клеток. Интересно, также наблюдалось, что у мышей, трансгенных по IGFBP3 человека, развивается гипергликемия, наблюдается снижение массы

островков и снижение ответа на стимуляцию инсулином-глюкозой (11), в то время как у мышей с нокдауном IGFBP3 не наблюдается каких-либо изменений с точки зрения гликометаболического контроля (12).

Drogan и коллеги недавно опубликовали, что у людей повышенные уровни циркулирующего IGFBP3 связаны с развитием T2D (13). Более того, недавнее исследование, проведенное группой Diabimmune Study, продемонстрировало, что уровни IGFBP3 коррелируют с положительностью аутоантител и вероятностью сероконверсии у детей с риском развития T1D, что указывает на роль циркулирующего IGFBP3 в раннем развитии аутоиммунитета бета-клеток (14).

TMEM219, рецептор IGFBP3, уже был описан как рецептор смерти, активация которого запускает опосредованный каспазой8 апоптоз в клетках-мишенях, что приводит к их потере (4).

Ось IGFBP3/TMEM219 при воспалительном заболевании кишечника

Кишечные стволовые клетки (ISC) располагаются на дне крипт тонкой и толстой кишки и контролируют регенерацию и обмен крипт. В частности, ISC могут дифференцироваться вдоль крипт с образованием бокаловидных клеток, энтероцитов, энтероэндокринных клеток (4).

Воспалительное заболевание кишечника (IBD) является иммуноопосредованным хроническим состоянием, которое включает две клинические формы, болезнь Крона (CD) и язвенный колит (UC), и поражает почти 2,5 миллиона человек в Европе и 1 миллион человек в США (15). Патогенез IBD все еще изучается, но недавние данные свидетельствуют о том, что нарушение дифференциации ISC в сторону клеток Панета, при CD подвздошной кишки, и в сторону бокаловидных клеток при UC может играть ключевую роль в начале заболевания. В частности, локальные сигнальные и воспалительные пути в слизистой оболочке реагируют на внешние раздражители и сохраняют количество и функцию ISC, тем самым поддерживая гомеостаз кишечника (16). Действительно, недавно Yancu et al. опубликовали результаты, подтверждающие роль IGFBP-3 в CD. Действительно, они продемонстрировали, что нокаут IGFBP3 играет роль в модулировании воспаления в мышиной модели колита с декстраном-сульфатом натрия (DSS) (17).

Авторы изобретения недавно обнаружили, что рецептор белка 3, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP3), а именно рецептор TMEM219, экспрессируется на ISC и что его взаимодействие с циркулирующим гормоном IGFBP3 контролирует судьбу и функцию ISC в модели кишечных нарушений при диабете и диабетической энтеропатии (4). Поскольку диабетическая энтеропатия и IBD имеют общие черты, такие как изменение гомеостаза стволовых клеток кишечника (ISC) и измененная морфология слизистой оболочки, эти результаты могут внести важный вклад в понимание до сих пор неизвестного патогенеза IBD и, возможно, приведут к внедрению нового терапевтического подхода к лечению IBD.

Имеющаяся в настоящее время терапия IBD основана на использовании противовоспалительных и иммунотерапевтических стратегий, которые отягчабтся несколькими побочными эффектами и эффективность которых в долгосрочной перспективе остается сомнительной. Хирургия также успешно применяется при запущенных стадиях заболевания, особенно при UC (15). Рецидивы заболевания, в основном при CD, также часты, что подчеркивает необходимость в другом терапевтическом подходе. В результате, идентификация новых терапевтических мишеней и стратегий лечения IBD имеет высокую клиническую значимость и потребность для медицинского сообщества.

WO 2016193497 и WO 2016193496 (полностью включенные в настоящий документ посредством ссылки) описывают внеклеточный домен TMEM219, Ecto -TMEM, действующий как эффективный терапевтический агент. Однако рецепторные конструкции менее желательны в качестве терапевтических агентов, чем антитела. Следовательно, по-прежнему существует потребность в дополнительных терапевтических агентах, таких как антитела или их производные, которые имитируют эффекты Ecto-TMEM.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе описаны антитела, которые с высокой аффинностью и специфичностью связываются с Ecto-TMEM человека (внеклеточный домен TMEM) и которые способны снижать или отменять связывание IGFBP3 с его родственным рецептором, TMEM219, при этом сами по себе не активируют путь TMEM219 при связывании. Такие нейтрализующие антитела полезны при лечении нарушений, при которых связывание IGFBP3 с

TMEM219 способствует патофизиологии заболевания, включая диабетическую энтеропатию, воспалительное заболевание кишечника (IBD), такое как язвенный колит и болезнь Крона, диабет 1 или 2 типа. Такие нейтрализующие антитела предоставляют выгодные терапевтические агенты, которые обладают терапевтической активностью, аналогичной лигандной ловушке на основе рецептора, Ecto-TMEM219.

В первом аспекте предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TMEM219 человека и ингибирует или снижает связывание IGFBP3 с указанным рецептором TMEM219.

Предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует, снижает или нейтрализует активацию рецептора TMEM219, индуцированную связыванием IGFBP3.

Активация рецептора TMEM219, индуцированная IGFBP3, может быть измерена любым известным в данной области способом или как описано ниже. В частности, IGFBP3-индуцированная активация рецептора TMEM219 может быть измерена путем измерения усиления апоптоза, как описано в настоящем документе, или снижения роста мини-кишки, как известно в данной области техники и описано в нескольких публикациях (4, 18, 27, 28).

Предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не активируют путь TMEM219 при связывании с TMEM219 человека.

В предпочтительном варианте осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент эффективны для сохранения бета-клеток у субъекта с диабетом и/или для профилактики разрушения островков, и/или для контроля уровня глюкозы в крови в модели *in vivo.*

В предпочтительном варианте осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент эффективны в уменьшении острого колита в модели *in vivo.*

В предпочтительном варианте осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент снижают DSS-индуцированное увеличение оценки DAI и гистологической оценки, или эффективно уменьшают острый колит в модели *in vivo.*

Настоящее изобретение также представляет выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающий, по меньшей мере, одной активностью, выбранной из:

a. увеличение роста мини-кишки у здорового субъекта, леченного IGFBP3;

b. увеличение роста мини-кишки у пациента с IBD;

c. увеличение роста мини-кишки у здорового субъекта, леченного сывороткой диабетической энтеропатии;

d. увеличение экспрессии EphB2 и/или LGR5 в мини-кишке здорового субъекта, леченного IGFBP3;

e. снижение экспрессии каспазы 8 в мини-кишке здорового субъекта, леченного IGFBP3;

f. уменьшение потери β-клеток в β-клетках, обработанных IGFBP3;

g. увеличение экспрессии инсулина в β- клетках, обработанных IGFBP3;

h. ингибирование или уменьшение DSS-индуцированного апоптоза клеток кишечника;

i. восстановление экспрессии PCNA в обработанной DSS толстой кишке;

j. снижение апоптоза β-клеток в β-клетках, обработанных IGFBP3;

k. снижение оценки инсулита в модели диабета на животных;

l. уменьшение начала диабета в модели диабета на животных;

m. защита бета-клетки от повреждения в модели диабета на животных;

n. предотвращение потери бета-клеток в модели диабета на животных.

Предпочтительно, увеличение a), b) и c) составляет, по меньшей мере, 20%; увеличение d) и e) составляет по меньшей мере, 30%, предпочтительно, по меньшей мере, 50%; уменьшение f) и увеличение g) по меньшей мере, на 10%, уменьшение k) и l) по меньшей мере, на 50%, предпочтительно, уменьшение l) по меньшей мере, на 70%. Предпочтительно, снижение j) составляет, по меньшей мере, 30%.

Изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему:

a. вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 4, 8, 10, 56, 59, 62, 65 и 68;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, 5, 11, 57, 60, 63, 66 и 69; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:3, 6, 7, 9, 12, 13, 58, 61, 64, 67 и 70; и/или

b. вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:14, 17, 20, 23, 26, 29, 71, 77, 80, 82 и 85;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:15, 18, 21, 24, 27, 30, 72, 78, 83 и 86; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:16, 19, 22, 25, 28, 31, 73, 74, 75, 76, 79, 81, 84, 87, 166 и 167.

Предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19 или Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact CDR TC01 или TC05 или

- SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 166 или Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact CDR TC03 или

- SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 167 или Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact CDR TC04 или

- SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87 или Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact CDR TM1.

Предпочтительно выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org);

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org); и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org); и/или

b. вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org);

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org); и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org).

Предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR, указанные в таблицах 2-5, 8-11, и в таблицах 3.1-3.4.

Предпочтительно, указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с TMEM219.

Предпочтительно, оно имеет, по меньшей мере, один вид деятельности, выбранный из:

a. увеличение роста мини-кишки у здорового субъекта, леченного IGFBP3;

b. увеличение роста мини-кишки у пациента с IBD;

c. увеличение роста мини-кишки у здорового субъекта, леченного сывороткой диабетической энтеропатии;

d. увеличение экспрессии EphB2 и/или LGR5 в мини-кишке здорового субъекта, леченного IGFBP3;

e. снижение экспрессии каспазы 8 в мини-кишке здорового субъекта, леченного IGFBP3;

f. уменьшение потери β-клеток в β-клетках, обработанных IGFBP3;

g. увеличение экспрессии инсулина в β- клетках, обработанных IGFBP3;

h. ингибирование или уменьшение DSS-индуцированного апоптоза клеток кишечника;

i. восстановление экспрессии PCNA в обработанной DSS толстой кишке;

j. снижение апоптоза β-клеток в β-клетках, обработанных IGFBP3.

Предпочтительно, увеличение a), b) и c) составляет, по меньшей мере, 20%; увеличение в d) и e) по меньшей мере, на 50%; уменьшение f) и увеличение g) по меньшей мере, на 10%.

Предпочтительно выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4, 1, 8, 10, 56, 59, 62, 65 и 68;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 5, 2, 11, 57, 60, 63, 66 и 69; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 6, 3, 7, 9, 12, 13, 58, 61, 64, 67 и 70; и/или

b. вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:17, 14, 20, 23, 26, 29, 71, 77, 80, 82 и 85;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:18, 15, 21, 24, 27, 30, 72, 78, 83 и 86; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO:19, 16, 22, 25, 28, 31, 73, 74, 75, 76, 79, 81, 84, 87, 166 и 167.

Предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19 или Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact CDR TC01 или TC05 или

- SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 166 или Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact CDR TC03 или

- SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 167 или Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact CDR TC04 или

- SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87 или Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact CDR TM1.

Предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org);

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org); и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org); и/или

b. вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org);

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org); и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org).

Предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. последовательность вариабельного домена тяжелой цепи аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: от SEQ ID NO:32 до SEQ ID NO:37 или от SEQ ID NO:88 до SEQ ID NO:95; или SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:169 и SEQ ID NO:170; или

b. последовательность вариабельного домена легкой цепи аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: от SEQ ID NO: 38 до SEQ ID NO: 43; или SEQ ID NO: 96 до SEQ ID NO: 103 или SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172 или SEQ ID NO: 173;

c. вариабельный домен легкой цепи (a) и вариабельный домен тяжелой цепи (b).

Еще более предпочтительно, выделенное антитело представляет собой TC01, TC03, TC04, TC05, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10 или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно, выделенное антитело представляет собой TC01, TC05, TC03, TC04 или TM1 или его антигенсвязывающий фрагмент, как указано в таблицах 4, 7 и 10-13, и в таблицах 3.1-3.4. Предпочтительно, выделенное антитело представляет собой TC01.

Еще более предпочтительно, выделенное антитело представляет собой TC01, имеющее SEQ ID NO:33 и SEQ ID NO:39, TC03, имеющее SEQ ID NO:168 и SEQ ID NO:171, TC04, имеющее SEQ ID NO:169 и SEQ ID NO:172, TC05, имеющее SEQ ID NO:170 и SEQ ID NO:173, TA02, имеющее SEQ ID NO:32 и SEQ ID NO:38, TC01, имеющее SEQ ID NO:33 и SEQ ID NO:39, TC02, имеющее SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:40, TD01, имеющее SEQ ID NO:35 и SEQ ID NO:41, TE01, имеющее SEQ ID NO:36 и SEQ ID NO:42, TG02, имеющее SEQ ID NO:37 и SEQ ID NO:43, TE02.1, имеющее SEQ ID NO:88 и SEQ ID NO:96, TE02.2, имеющее SEQ ID NO:89 и SEQ ID NO:97, TE02.3, имеющее SEQ ID NO:90 и SEQ ID NO:98, TE03, имеющее SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO:99, TE04, имеющее SEQ ID NO:92 и SEQ ID NO:100, TE07, имеющее SEQ ID NO:93 и SEQ ID NO:101, TE10, имеющее SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:102, TM1, имеющее SEQ ID NO:95 и SEQ ID NO:103.

Предпочтительно, выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с TMEM219 человека с константой

аффинности ниже или равной 10^{-7} М, предпочтительно, с константой аффинности ниже или равной 2 x 10^{-8} М.

Изобретение также представляет выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое:

(a) специфически связывается с эпитопом на IGFBP3, например, с таким же или сходным эпитопом, как эпитоп, распознаваемый моноклональным антителом TC01, TC03, TC04, TC05, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19, и в таблицах 3.1-3.4; или

(b) перекрестно конкурирует за связывание с моноклональным антителом TC01, TC03, TC04, TC05, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4; или

(c) демонстрирует такую же или подобную аффинность связывания или специфичность, или и то, и другое, как любой из TC01, TC03, TC04, TC05, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4; или

(d) имеет одно или несколько биологических свойств молекулы антитела, описанной в настоящем документе, например, молекулы антитела, выбранной, например, из любой из TC01, TC03, TC04, TC05, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4; или

(e) имеет одно или несколько фармакокинетических свойств молекулы антитела, описанных в настоящем документе, например, молекулы антитела, выбранной, например, из любой из TC01, TC03, TC04, TC05, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4.

Предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляет собой человеческое или гуманизированное антитело.

Более предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляет собой антитело IgG2 или IgG4, предпочтительно, каппа-антитело IgG2, лямбда-антитело IgG2,

каппа-антитело IgG4 или лямбда-антитело IgG4, предпочтительно, указанное IgG2 или IgG4 представляет собой IgG2 человека или IgG4 человека.

Изобретение представляет выделенный полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как определено выше, предпочтительно, указанный полинуклеотид представляет собой кДНК.

Изобретение относится к вектору, содержащему указанный выше полинуклеотид, предпочтительно, указанный вектор выбран из группы, состоящей из плазмиды, вирусного вектора, не эписомного вектора млекопитающего, вектора экспрессии и рекомбинантного вектора экспрессии.

Изобретение дополнительно представляет выделенную клетку, содержащую полинуклеотид, как определено выше, или вектор, как определено выше, предпочтительно, выделенная клетка представляет собой гибридому, или клетку яичника китайского хомячка (CHO), или эмбриональную клетку почки человека (HEK293).

Изобретение дополнительно относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, или выделенному полинуклеотиду, или вектору, или выделенным клеткам, определенным выше, для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно, для применения при лечении: диабета, нарушения кишечника и/или пищеварительного тракта, синдрома мальабсорбции, кахексии или диабетической энтеропатии, предпочтительно, диабет представляет собой диабет I типа или II типа, предпочтительно, нарушение кишечника и/или пищеварительного тракта представляет собой воспалительное заболевание кишечника, целиакию, язвенный колит, болезнь Крона или кишечную непроходимость.

Изобретение также представляет фармацевтическую композицию, содержащую выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или выделенный полинуклеотид, или вектор, или выделенную клетку, как определено выше, и фармацевтически приемлемый носитель, предпочтительно, для применения при лечении: диабета, нарушения кишечника и/или пищеварительного тракта, синдрома мальабсорбции, кахексии или диабетической энтеропатии, предпочтительно, нарушение кишечника и/или пищеварительного тракта представляет собой воспалительное заболевание

кишечника, целиакию, язвенный колит, болезнь Крона или кишечную непроходимость.

Изобретение представляет способ ингибирования связывания IGFBP3 с рецептором TMEM219, включающему контакт TMEM219 с антителом или композицией, как определено выше.

Изобретение представляет способ лечения: диабета, предпочтительно диабета 1 типа или 2 типа, нарушения кишечника и/или пищеварительного тракта, синдрома мальабсорбции, кахексии или диабетической энтеропатии, предпочтительно нарушения кишечника и/или пищеварительного тракта, воспалительного заболевания кишечника, IBD, целиакии, болезни Крона или кишечной непроходимости, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или выделенный полинуклеотид, или вектор, или выделенную клетку, как определено выше, и фармацевтически приемлемый носитель, или введение субъекту, нуждающемуся в этом, выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или выделенного полинуклеотида, или вектора, или выделенной клетки, как определено выше.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающему получение клетки, как определено выше, и получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления, комбинация включает ингибитор IGFBP3 (например, молекулу анти-TMEM антитела, как описано в настоящем документе). Таким образом, в настоящем документе описаны композиции и способы обнаружения IGFBP3, а также способы лечения различных нарушений, включая диабет, а также нарушения кишечника и/или пищеварительного тракта, с использованием молекул анти-TMEM антител и их комбинаций.

Соответственно, в одном аспекте, изобретение относится к молекуле антитела (например, выделенной или рекомбинантной молекуле антитела), обладающей одним или несколькими из следующих свойств:

- связывается с TMEM219, например, с TMEM219 человека, с высокой аффинностью, например, с константой аффинности, по меньшей мере,

примерно $4x10^6$ M^{-1}, предпочтительно, 10^7 M^{-1}, обычно примерно 10^8 M^{-1}, и более типично, примерно от 10^9 M^{-1} до 10^{10} M^{-1} или сильнее;

- ингибирует или снижает связывание IGFBP3 с его рецептором, TMEM;

- специфически связывается с эпитопом на TMEM219, например, таким же или подобным эпитопу, что и эпитоп, распознаваемый моноклональным антителом TC01, TC03, TC04, TC04, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4;

- перекрестно конкурирует за связывание с моноклональным антителом TC01, TC03, TC04, TC04, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4;

- демонстрирует такую же или подобную аффинность связывания или специфичность, или и то, и другое, как любой из TC01, TC03, TC04, TC04, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4;

- демонстрирует такую же или подобную аффинность или специфичность связывания, или и то, и другое, как молекула антитела (например, вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи), описанные в таблицах 2-19;

- демонстрирует такую же или подобную аффинность связывания или специфичность, или и то, и другое, как молекула антитела (например, вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи), имеющая аминокислотную последовательность, показанную в таблицах 4, 5, 10, 11, 16, 17;

- демонстрирует такую же или подобную аффинность или специфичность связывания, или и то, и другое, как молекула антитела (например, вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи), кодируемая нуклеотидной последовательностью, показанной в таблицах 6-7 и 12, 13, 16, 17;

- связывает тот же или перекрывающийся эпитоп со второй молекулой антитела к TMEM219, где вторая молекула антитела представляет собой молекулу антитела, описанную в настоящем документе, например, молекулу антитела, выбранную из TC01, TC03, TC04, TC04, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02,

TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4;

- имеет одно или несколько биологических свойств молекулы антитела, описанной в настоящем документе, например, молекулы антитела, выбранной, например, из любого из TC01, TC03, TC04, TC04, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4;

- имеет одно или несколько фармакокинетических свойств молекулы антитела, описанных в настоящем документе, например, молекулы антитела, выбранной, например, из любого из TC01, TC03, TC04, TC04, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4;

- ингибирует одну или несколько активностей IGFBP3, например, приводит к одному или нескольким из следующих результатов: увеличение, по меньшей мере, на 20% развития мини-кишки из образца ткани, полученного от пациента с IBD, по сравнению с необработанными образцами и/или увеличение, по меньшей мере, на 20% развития роста мини-кишки в присутствии IGFBP3 по сравнению с необработанными образцами, или увеличение, по меньшей мере, на 20% развития роста мини-кишки в присутствии сыворотки диабетической энтеропатии по сравнению с необработанными образцами;

- вызывает увеличение EphB2 и LGR5, по меньшей мере, на 50% по сравнению с образцами, обработанными IGFBP3; или снижение уровня экспрессии каспазы 8, по меньшей мере, на 50% по сравнению с образцами, обработанными IGFBP3; или

- ингибирует одну или несколько активностей IGFBP3, например, приводит к одному или нескольким из: снижению потери бета-клеток или увеличению инсулина; где снижение потери бета-клеток или увеличение уровня инсулина составляет, по меньшей мере, 10% по сравнению с образцами, обработанными IGFBP3;

- ингибирует, снижает или нейтрализует одну или несколько активностей IGFBP3, что приводит к блокаде или снижению индуцированного IGFBP3 апоптоза;

- связывает TMEM219 человека и перекрестно реагирует с TMEM219 яванского макака.

Также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы антител, векторы экспрессии, клетки-хозяева и способы получения молекул антител. Также представлены иммуноконъюгаты, мульти- или биспецифических молекул антител и фармацевтических композиций, содержащих молекулы антител.

Не будучи связанными какой-либо теорией, считается, что ось IGFBP3/TMEM219 дисфункциональна при воспалительных заболеваниях кишечника (IBD), что приводит к потере ISC и изменению функции слизистого барьера, в который в дальнейшем проникают микробы, запускающие и поддерживающие активацию иммунного ответа и воспаление. Использование агентов, которые блокируют взаимодействие IGFBP3-TMEM219 при IBD, может защитить ISC и сохранить целостность кишечного барьера, тем самым предотвращая развитие локального воспаления.

Кроме того, активация передачи сигналов TMEM219 увеличивает апоптоз бета-клеток за счет повышения экспрессии каспазы 8 и снижения экспрессии инсулина. IGFBP3 повышен в сыворотке пациентов с пре-T1D и пре-T2D, и у пациентов с недавно диагностированным и длительно существующим диабетом, и TMEM219 экспрессируется в бета-клетках. Экспрессия или сверхэкспрессия TMEM219 способствует разрушению бета-клеток и влияет на массу бета-клеток, и последующая гипергликемия/воспаление вызывает процесс во время начала и прогрессирования диабета. Измененный гликемический контроль и воспаление в пред-диабетических состояниях способствуют увеличению продуцирования IGFBP3 в печени, что может таргетировать TMEM219, экспрессируемый на бета-клетках поджелудочной железы, и запускать петлю, в которой сверхэкспрессия TMEM219 параллельна увеличению высвобождения IGFBP3. Затем TMEM219 может вызвать гибель бета-клеток и, таким образом, таргетирование оси IGFBP3/TMEM219 может предотвратить такую гибель клеток.

Молекулы анти-TMEM антител, описанные в настоящем документе, можно использовать (отдельно или в комбинации с другими агентами или терапевтическими методами) для лечения, профилактики и/или диагностики

заболеваний, таких как диабет, а также нарушения кишечника и/или пищеварительного тракта, синдром мальабсорбции, воспалительные заболевания кишечника, кахексия, IBD, целиакия, диабетическая энтеропатия. Кроме того, в настоящем документе описаны способы и композиции, содержащие комбинацию двух, трех или нескольких терапевтических средств, выбранных из одной, двух или всех следующих категорий (i)-(iii): (i) агент для лечения диабета; (ii) противовоспалительный агент; или (iii) иммунотерапевтический агент.

Дополнительный терапевтический агент может быть выбран из агента для лечения диабета, включающего: инсулин, инсулин гларгин, как подробно описано в Vandana, 2014 (19, включено посредством ссылки), бигуанид, ингибиторы глюкозидазы, тиазолидиндион, ингибиторы DPP-4, агонисты рецептора GLP-1, как подробно описано в George et al. 2013 (20, включено посредством ссылки)), агент, используемый для профилактики диабета, аспирин, антикоагулянты и агенты, препятствующие агрегации тромбоцитов (такие как эноксапарин, эпарин, сулодексид); лекарственные средства для снижения холестерина (такие как статины, секвестранты желчных кислот, эзетимиб, фибраты, как описано у Marsha et al. 2011 (21, включено посредством ссылки)); другие агенты, снижающие артериальное давление (такие как тиазид, ингибиторы ACE, бета- и альфа-блокаторы); антиапоптозный агент, противовоспалительный агент, кортикостероиды и иммунодепрессант (22, включено посредством ссылки), адъювантная терапия при трансплантации органов, защитный агент в подходе клеточной терапии, болеутоляющее средство, антибиотик, пробиотики, блокаторы TNF-альфа (23, включено посредством ссылки), ингибиторы SGLT2 (такие как производные глифлозина), ингибиторы интегрина (24, включено посредством ссылки).

Способы измерения увеличения роста мини-кишки по сравнению с ростом мини-кишки в присутствии IGFBP3 и/или в присутствии сыворотки диабетической энтеропатии, известны в данной области техники и описаны в нескольких публикациях (4, 18, 27, 28).

Способы измерения повышения и/или снижения экспрессии EphB2, LGR5 или каспазы 8 по сравнению с экспрессией в присутствии IGFBP3 известны в данной области техники и включают количественную ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР в

реальном времени, микрочип, нозерн-блоттинг, РНК-Seq (29,30) или как описано в разделе, относящемся к способам, ниже.

Способы измерения снижения потери бета-клеток по сравнению с потерей бета-клеток в присутствии IGFBP3 известны в данной области техники и включают анализы клеточной пролиферации (окрашивание CFSE, окрашивание кальцеином/PI, исключение трипановым синим, окрашивание BrdU, MTT). анализы апоптоза (TUNEL, активация и обнаружение каспазы, связывание аннексина V) или как описано в разделе, относящемся к способам, ниже.

Способы измерения повышения уровня инсулина по сравнению с уровнем инсулина в присутствии IGFBP3 известны в данной области техники и включают вестерн-блоттинги, масс-спектрометрию ELISA (31-33).

Способы измерения снижения апоптоза по сравнению с апоптозом в присутствии IGFBP3, известны в данной области техники и включают фрагментацию ДНК, анализ активации каспазы, пермеабилизацию митохондриальной мембраны, связывание аннексина V (34) или способы, описанные в разделе, относящемся к способам, ниже.

В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела связывается с IGFBP3 с высокой аффинностью, например, с примерно одинаковой KD или, по меньшей мере, примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% выше или ниже, чем KD молекулы анти-TMEM антитела мыши, или химерной молекулы анти-TMEM антитела, или молекулы коммерчески доступного анти-TMEM антитела. В некоторых вариантах осуществления, KD молекулы мышиного или химерного анти-TMEM антитела составляет менее приблизительно 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 или 0,05 нМ, например, по данным способа Biacore или KinExA = анализов кинетического исключения. В некоторых вариантах осуществления, KD молекулы мышиного или химерного антитела против TMEM219 составляет менее примерно 0,2 нМ. В других вариантах осуществления KD молекулы мышиного или химерного анти-IGFBP3 антитела составляет менее примерно 10, 5, 3, 2 или 1 нМ, например, при измерении путем связывания с клетками, экспрессирующими IGFBP3 (например, клетки 300,19). В некоторых вариантах осуществления, KD молекулы мышиного или химерного анти-IGFBP3 антитела составляет менее примерно 1 нМ.

Способы измерения связывания с TMEM219 известны в данной области техники как анализы взаимодействий белок-белок и включают ELISA, ко-иммунопреципитацию, поверхностный плазмонный резонанс, резонансный перенос энергии FRET-Форстера (35) или как описано в разделе, относящемся к способам, ниже.

В некоторых вариантах осуществления, уровень экспрессии молекулы антитела выше, например, по меньшей мере, примерно в 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз выше, чем уровень экспрессии молекулы мышиного или химерного антитела, например, молекулы мышиного, коммерческого или химерного анти-TMEM антитела. В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела экспрессируется в клетках HEK293, клетках CHO или любой подходящей клеточной линии млекопитающих, известной в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, молекула анти-TMEM219 антитела снижает одну или несколько ассоциированных с TMEM активностей с IC50 (концентрация при 50% ингибировании), которая примерно такая же или ниже, например, по меньшей мере, примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% ниже, чем IC50 молекулы мышиного, коммерческого или химерного анти-TMEM антитела, например, молекулы мышиного, коммерческого или химерного анти-TMEM антитела, описанной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, молекула анти-TMEM антитела обладает улучшенной стабильностью, например, по меньшей мере, примерно в 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз более стабильной in vivo или in vitro, чем молекула мышиного, коммерческого или химерного анти-TMEM антитела, такая как HPA051870, как определено в разделе, относящемся к материалам, ниже.

В одном варианте осуществления молекула анти-TMEM антитела представляет собой молекулу гуманизированного антитела.

В другом варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну антигенсвязывающую область, например, вариабельную область или ее антигенсвязывающий фрагмент, из антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого нуклеотидной последовательностью в таблицах 6, 7, 12, 13; или

последовательностью, по существу идентичной (например, идентичной, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более) любой из вышеупомянутых последовательностей.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две, три или четыре вариабельные области антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13; или последовательностью, по существу идентичную (например, идентичную, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более) любой из вышеупомянутых последовательностей.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну или две вариабельные области тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13; или последовательностью, по существу идентичной (например, идентичной, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более) любой из вышеупомянутых последовательностей.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну или две вариабельные области легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13; или последовательностью, по существу идентичной (например, идентичной, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более) любой из вышеупомянутых последовательностей.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит константную область тяжелой цепи IgG4, например, IgG4 человека. В одном варианте осуществления, IgG4 человека содержит замену в положении

228 (например, замену Ser на Pro). В одном варианте осуществления, IgG4 человека содержит замену в положении 235 (например, замену Leu на Glu). В одном варианте осуществления, IgG4 человека содержит замену в положении 228 (например, замену Ser на Pro) и замену в положении 235 (например, замену Leu на Glu). В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит константную область тяжелой цепи IgG1, например, IgG1 человека. В одном варианте осуществления, IgG1 человека содержит замену в положении 297 (например, замену Asn на Ala). В одном варианте осуществления, IgG1 человека содержит замену в положении 250, замену в положении 428 или и то, и другое (например, замену Thr на Gln в положении 250 и/или замену Met на Leu в положении 428). В одном варианте осуществления, IgG1 человека содержит замену в положении 234, замену в положении 235 или и то, и другое (например, замену Leu на Ala в положении 234 и/или замену Leu на Ala в положении 235).

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит константную область легкой каппа-цепи, например, константную область легкой каппа-цепи человека. В одном варианте осуществления, константная область легкой цепи содержит амино последовательность, представленную в Таблице 8, или последовательность, по существу идентичную (например, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или выше идентичную) ей.

В другом варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит константную область тяжелой цепи IgG4, например, IgG4 человека, и константную область легкой каппа-цепи, например, константную область легкой каппа-цепи человека. В одном варианте осуществления, IgG1 или IgG4 человека содержит замену в вариабельной области для снижения агрегации, снижения гетерогенности заряда, повышения аффинности и модулирования связывания антигена; удаление путем мутации горячих точек нестабильности в CDR, предполагаемых сайтов N-гликозилирования в вариабельной области, как описано в (26), включенном посредством ссылки.

В другом варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит вариабельный домен тяжелой цепи и константную область, где вариабельный домен легкой цепи и константная область или оба, содержат

аминокислотную последовательность любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11 или кодируемую нуклеотидной последовательностью в таблицах 6, 7, 12, 13; или последовательностью, по существу идентичной (например, идентичной, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более) любой из вышеупомянутых последовательностей. Молекула анти-TMEM антитела необязательно содержит лидерную последовательность тяжелой цепи, легкой цепи или обеих.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три определяющих комплементарность области (CDR) из вариабельной области тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах. 6, 7, 12, 13; или последовательностью, по существу идентичной (например, идентичной, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более) любой из вышеупомянутых последовательностей.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три CDR (или вместе все CDR) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, показанную в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого нуклеотидной последовательностью, показанной в таблицах 6-7, 12, 13. В одном варианте осуществления, один или несколько CDR (или все вместе CDR) имеют одно, два, три, четыре, пять, шесть или более изменений, например, аминокислотных замен или делеций относительно аминокислотной последовательности, показанной в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемой нуклеотидной последовательностью, показанной в таблицах 6-7, 12, 13.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три CDR из вариабельной области легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11

или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13; или последовательностью, по существу идентичной (например, идентичной, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или выше) любой из вышеупомянутых последовательностей.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три CDR (или вместе все CDR) вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, показанную в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной в таблицах 6, 7, 12, 13. В одном варианте осуществления, один или несколько CDR (или все вместе CDR) имеют одно, два, три, четыре, пять, шесть или более изменений, например, аминокислотных замен или делеций относительно аминокислотной последовательности, показанной в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемой нуклеотидной последовательностью, показанной в таблицах 6, 7, 12, 13. В некоторых вариантах осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит замену в CDR легкой цепи, например, одну или несколько замен в CDR1, CDR2 и/или CDR3 легкой цепи.

В другом варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR (или вместе все CDR) из вариабельной области тяжелой и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, показанную в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной в таблицах 6, 7, 12, 13. В одном варианте осуществления, одна или несколько CDR (или все вместе CDR) имеют одно, два, три, четыре, пять, шесть или более изменений, например аминокислотных замен или делеций, относительно аминокислотной последовательности, показанной в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемой нуклеотидной последовательностью, показанной в таблицах 6, 7, 12, 13.

В одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит все шесть CDR антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02. 2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13, или близкородственными CDR, например, CDR, которые

являются идентичными, или которые имеют, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или вставок, например, консервативных замен). В одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела может содержать любую CDR, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит замену в CDR легкой цепи, например, одну или несколько замен в CDR1, CDR2 и/или CDR3 легкой цепи. В другом варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три CDR в соответствии с Kabat et al. (например, по меньшей мере, одну, две или три CDR в соответствии с определением Kabat, приведенным в таблицах 2-5) из вариабельной области тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13; или последовательностью, по существу идентичной (например, идентичной, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или выше) любой из вышеупомянутых последовательностей; или которые имеют, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или вставок, например, консервативных замен) относительно одной, двух или трех CDR в соответствии с Kabat et al., показанных в таблицах 2-5, 8-11.

В другом варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три CDR в соответствии с Kabat et al. (например, по меньшей мере, одну, две или три CDR в соответствии с определением Kabat, приведенным в таблицах 2-5, 8-11) из вариабельной области легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из любой из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13; или последовательностью, по существу идентичной (например, идентичной, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или выше) любой из вышеупомянутых последовательностей; или

которые имеют, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или вставок, например, консервативных замен) относительно одной, двух или трех CDR в соответствии с Kabat et al., показанных в таблицах 2-5, 8-11.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR в соответствии с Kabat et al. (например, по меньшей мере, одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR в соответствии с определением Kabat, приведенным в таблицах 2-5, 8-11) из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13; или последовательностью, по существу идентичную (например, идентичную, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или выше) любой из вышеупомянутых последовательностей; или которые имеют, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или вставок, например, консервативных замен) относительно одной, двух, трех, четырех, пяти или шести CDR по Kabat et al., показанных в таблицах 2-5, 8-11.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела включает все шесть CDR по Kabat et al. (например, все шесть CDR в соответствии с определением Kabat, как указано в таблицах 2-5, 8-11) из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2–5, 8–11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах. 6, 7, 12, 13; или последовательностью, по существу идентичную (например, идентичную, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или выше) любой из вышеупомянутых последовательностей; или которые имеют, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или вставок, например, консервативных

замен) относительно всех шести CDR по Kabat et al., показанных в таблицах 2-5, 8-11. В одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела может включать любую CDR, описанную в настоящем документе.

В другом варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три гипервариабельные петли по Chothia или Kabat (например, по меньшей мере, одну, две или три гипервариабельные петли в соответствии с определением по Chothia или по Kabat, приведенным в таблицах 2-5, 8-11) из вариабельной области тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13; или, по меньшей мере, аминокислот из тех гипервариабельных петель, которые контактируют с TMEM; или которые имеют, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или вставок, например, консервативных замен) относительно одной, двух или трех гипервариабельных петель по Chothia et al., показанных в таблицах 2-5, 8-11.

В другом варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три гипервариабельные петли Chothia (например, по меньшей мере, одну, две или три гипервариабельные петли в соответствии с определением Chothia, приведенным в таблицах 2-5, 8-11) вариабельной области легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13; или, по меньшей мере, аминокислоты из тех гипервариабельных петель, которые контактируют с TMEM; или которые имеют, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или вставок, например, консервативных замен) относительно одной, двух или трех гипервариабельных петель по Chothia et al., показаны в таблицах 2-5, 8-11.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две, три, четыре, пять или шесть гипервариабельных петель (например, по меньшей мере, одну, две, три, четыре, пять или шесть гипервариабельных петель по определению Chothia, как указано в таблицах 2-5, 8-11), из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13; или, по меньшей мере, аминокислоты из тех гипервариабельных петель, которые контактируют с TMEM; или которые имеют, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или вставок, например, консервативных замен) относительно одной, двух, трех, четырех, пяти или шести гипервариабельных петель по Chothia et al., показанных в таблицах 2-5, 8-11.

В одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела включает все шесть гипервариабельных петель (например, все шесть гипервариабельных петель в соответствии с определением Chothia, приведенным в таблицах 2-5, 8-11) антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела выбран из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируюмого нуклеотидной последовательностью в таблицах 6, 7, 12, 13 или близкородственными гипервариабельными петлями, например, гипервариабельными петлями, которые идентичны или имеют, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или вставок, например, консервативных замен); или которые имеют, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или вставок, например, консервативных замен) относительно всех шести гипервариабельных петель по Chothia et al. показанных в таблицах 2-5, 8-11. В одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела может включать любую описанную в настоящем документе гипервариабельную петлю.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три гипервариабельные петли, которые имеют те же канонические структуры, что и соответствующая гипервариабельная петля антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого нуклеотидной последовательностью в таблицах 6, 7, 12, 13, например, те же канонические структуры, что и по меньшей мере, петля 1 и/или петля 2 вариабельных доменов тяжелой и/или легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе. См., например, Chothia et al., (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817; Tomlinson et al., (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798 для описания канонических структур гипервариабельной петли. Эти структуры могут быть определены путем проверки таблиц, описанных в этих ссылках.

В некоторых вариантах осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит комбинацию CDR или гипервариабельных петель, определенных в соответствии с Kabat et al. и Chothia et al.

В одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три CDR или гипервариабельные петли из вариабельной области тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируется последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13, в соответствии с определением Kabat и Chothia (например, по меньшей мере, одну, две или три CDR или гипервариабельные петли в соответствии с определением Kabat и Chothia, как указано в таблицах 2-5, 8-11); или кодируется последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13; или последовательностью, по существу идентичную (например, идентичную, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или выше) любой из вышеупомянутых последовательностей; или которые содержат, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или вставок, например, консервативных замен)

относительно одной, двух или трех CDR или гипервариабельных петель по Kabat и/или Chothia, показанных в таблицах 2-5, 8-11.

Например, молекула анти-TMEM антитела может содержать VH CDR1 по Kabat et al. или VH гипервариабельную петлю 1 по Chothia et al., или их комбинацию, например, как показано в таблицах 2-5, 8-11. Молекула анти-TMEM антитела может дополнительно включать, например, CDR 2-3 VH по Kabat et al. и VL CDR 1-3 по Kabat et al., например, как показано в таблицах 2-5, 8-11. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, каркасные области определены на основе комбинации CDR, определенных по Kabat et al., и гипервариабельных петель, определенных по Chothia et al. Например, молекула анти-TMEM антитела может включать FR1 VH, определенную на основе гипервариабельной петли 1 VH по Chothia et al. и FR2 VH, определенную на основе CDR 1-2 VH в соответствии с Kabat et al., например, как показано в таблицах 2-5, 8-11, 6, 7, 12, 13. Молекула анти-TMEM антитела может дополнительно включать, например, FR 3-4 VH, определенные на основе CDR 2-3 VH по Kabat et al., и VL FR 1-4, определенные на основе VL CDR 1-3 по Kabat et al.

Молекула анти-TMEM антитела может содержать любую комбинацию CDR или гипервариабельных петель в соответствии с определениями Kabat и Chothia. В одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три CDR из вариабельной области легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе, например, антитела, выбранного из любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируется последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13 в соответствии с определением Kabat и Chothia (например, по меньшей мере, одну, две или три CDR в соответствии с определением Kabat и Chothia, как указано в таблицах 3.3 и 3.4). Предпочтительными анти-TMEM антителами являются TC01 и TM1, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируются нуклеотидной последовательностью в таблицах 6, 7, 12, 13. В варианте осуществления, например, варианте осуществления, содержащем вариабельную область CDR (например, CDR Chothia или CDR Kabat) или другую последовательность, упомянутую в настоящем документе, например, в

таблицах 2-5, 8-11, молекула антитела представляет собой молекулу моноспецифического антитела, молекулу биспецифического антитела или молекулу антитела, которая содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела, например, полуантитело или антигенсвязывающий фрагмент полуантитела. В вариантах осуществления, молекула антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела, обладающую первой специфичностью связывания в отношении IGFBP3 и второй специфичностью связывания в отношении TNF-альфа, интегрина, IL1, IL12 и IL23, CD3, CD20, CD80, CD86.

В одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VHCDR1, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1, 4, 8, 10, 56, 59, 62, 65 и 68; аминокислотную последовательность VHCDR2, выбранную из любой из SEQ ID NO: 2, 5, 11, 57, 60, 63, 66 и 69; и аминокислотную последовательность VHCDR3, выбранную из любой из SEQ ID NO: 3, 6, 7, 9, 12, 13, 58, 61, 64, 67 и 70; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VLCDR1, выбранную из любой из SEQ ID NO: 14, 17, 20, 23, 26, 29, 71, 77, 80, 82 и 85, аминокислотную последовательность VLCDR2, выбранную из любой из SEQ ID NO: 15, 18, 21, 24, 27, 30, 72, 78, 83 и 86, и аминокислотную последовательность VLCDR3, выбранную из SEQ ID NO: 16, 19, 22, 25, 28, 31, 73, 74, 75, 76, 79, 81, 84 и 87.

В одном варианте осуществления, вариабельный каркас легкой или тяжелой цепи (например, область, охватывающая, по меньшей мере, FR1, FR2, FR3 и, необязательно, FR4) молекулы анти-TMEM антитела может быть выбран из: (a) вариабельного каркаса легкой или тяжелой цепи, включающего, по меньшей мере, 80%, 85%, 87%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98% или предпочтительно 100% аминокислотных остатков из вариабельного каркаса легкой или тяжелой цепи человека, например, остаток каркасной области вариабельной области легкой или тяжелой цепи из зрелого антитела человека, последовательности зародышевой линии человека или консенсусной последовательности человека; (b) вариабельного каркаса легкой или тяжелой цепи, включающего от 20% до 80%, от 40% до 60%, от 60% до 90% или от 70%

до 95% аминокислотных остатков из вариабельного каркаса легкой или тяжелой цепи человека, например, остаток каркасной области вариабельной области легкой или тяжелой цепи из зрелого антитела человека, последовательности зародышевой линии человека или консенсусной последовательности человека; (c) каркаса нечеловеческого происхождения (например, каркаса грызуна); или (d) каркаса нечеловеческого происхождения, модифицированного, например, для удаления антигенных или цитотоксических детерминант, например, деиммунизированного или частично гуманизированного. В одном варианте осуществления, вариабельный каркасный участок легкой или тяжелой цепи (в частности, FR1, FR2 и/или FR3) содержит последовательность вариабельного каркаса легкой или тяжелой цепи на, по меньшей мере, 70, 75, 80, 85, 87, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичного или идентичного каркасам сегмента VL или VH гена зародышевой линии человека.

В некоторых вариантах осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий, по меньшей мере, одно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, десять, пятнадцать, двадцать или более изменений, например аминокислотных замен или делеций.

В одном варианте осуществления, вариабельная область тяжелой или легкой цепи, или обе, молекулы анти-TMEM антитела включает аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, или нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе (например,, последовательностью нуклеиновой кислоты, как показано в таблицах 6, 7, 12, 13), или ее комплементом, например, в условиях низкой строгости, средней строгости или высокой строгости, или других условиях гибридизации, описанных в настоящем документе.

В другом варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две, три или четыре антигенсвязывающих области, например, вариабельные области, имеющие аминокислотную последовательность, как указано в таблицах 2-5, 8-11, или последовательность, по существу идентичную ей (например, последовательность, идентичную ей, по меньшей мере, приблизительно на 85%, 90%, 95%, 99% или более, или отличающуюся не более чем на 1, 2, 5, 10 или 15 аминокислотных остатков от

последовательностей, показанных в таблицах 2-5, 8-11. В другом варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела включает домен VH и/или VL, кодируемый нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность, как указано в таблицах 2-5, 8-11, или последовательность, по существу идентичную ей (например, последовательность, идентичную ей, по меньшей мере, приблизительно на 85%, 90%, 95%, 99% или более, или отличающуюся не более чем на 3, 6, 15, 30 или 45 нуклеотидов от последовательностей показанных в таблицах 2-5, 8-11.

В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три CDR из вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, как указано в таблицах 2-5, 8-11, или последовательность, по существу гомологичную ей (например, последовательность, по меньшей мере, примерно на 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичную им и/или имеющая одну, две, три или более замен, вставок или делеций, например, консервативных замен). В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две или три CDR из вариабельной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, как указано в таблицах 2-5, 8-11, или последовательность, по существу гомологичную ей (например, последовательность, по меньшей мере, примерно на 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичную ей и/или имеющую одну, две, три или более замен, вставок или делеций, например, консервативных замен). В еще одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела содержит, по меньшей мере, одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи, имеющих аминокислотную последовательность, как указано в таблицах 2-5, 8-11), или последовательность, по существу гомологичную ей (например, последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичную ей и/или имеющую одну, две, три или более замен, вставок или делеций, например, консервативных замен).

В других вариантах осуществления, молекула анти-TMEM антитела имеет константную область тяжелой цепи (Fc), выбранную, например, из константных областей тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE; в частности, выбранную из, например, константных областей тяжелой цепи IgG1,

IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, константной области тяжелой цепи IgG1 или IgG4 (например, IgG1, IgG2 или IgG4 человека). В одном варианте осуществления, константная область тяжелой цепи представляет собой IgG1 человека. В другом варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела имеет константную область легкой цепи, выбранную, например, из константных областей легкой цепи каппа или лямбда. В одном варианте осуществления, константная область изменена, например, мутирована, для модификации свойств молекулы анти-TMEM антитела (например, для увеличения или уменьшения одного или нескольких из: связывания Fc рецептора, гликозилирования антитела, количества остатков цистеина, функции эффекторных клеток, функции комплемента, периода полураспада, агрегации и стабильности). В некоторых вариантах осуществления, молекулы анти-TMEM антитела содержат мутантный IgG4 человека.

В одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела является выделенной или рекомбинантной.

В одном варианте осуществления, молекула анти-TMEM антитела представляет собой молекулу гуманизированного или антитела человека.

Изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит одну или обе нуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей, CDR, гипервариабельные петли, каркасные области молекул анти-TMEM антител, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, нуклеотидная последовательность, которая кодирует молекулу анти-TMEM антитела, является кодон-оптимизированной. Например, изобретение относится к первой и второй нуклеиновой кислоте, кодирующей вариабельные области тяжелой и легкой цепи, соответственно, молекулы анти-TMEM антитела, выбранного из одного или нескольких, например, любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13, или последовательностью, по существу идентичной им. Например, нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную последовательность, как указано в таблицах 6, 7, 12, 13, или последовательность, по существу идентичную ей (например,

последовательность, по меньшей мере, примерно на 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичную ей или отличающуюся не более чем на 3, 6, 15, 30 или 45 нуклеотидов от последовательностей, показанных в таблицах 6-7, 12, 13).

В других вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует вариабельный домен тяжелой цепи, и/или константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02..1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или кодируемого последовательностью нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13; или последовательностью, по существу идентичную (например, последовательность, идентичную, по меньшей мере, примерно на 85%, 90%, 95%, 99% или более) любой из вышеупомянутых последовательностей.

В других вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует вариабельный домен легкой цепи и/или константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или последовательность нуклеотидов в таблицах 6, 7, 12, 13, или последовательность, по существу идентичную (например, последовательность, по меньшей мере, примерно на 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичную) любой из вышеупомянутых последовательностей.

Вышеупомянутые нуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельный домен тяжелой и легкой цепи анти-TMEM антитела, и константные области, могут присутствовать в отдельных молекулах нуклеиновой кислоты или в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновой кислоты содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую, по меньшей мере, одну, две или три CDR или гипервариабельные петли из вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, как указано в

таблицах 2-5, 8-11, или последовательность, по существу гомологичную ей (например, последовательность, по меньшей мере, примерно на 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичную ей, и/или имеющую одну, две, три или более замен, вставок или делеций, например, консервативных замен).

В другом варианте осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую, по меньшей мере, одну, две или три CDR или гипервариабельные петли из вариабельной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, как указано в таблицах 2-5, 8-11, или последовательность, по существу гомологичную ей (например, последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичную ей и/или имеющую одну, две, три или более замен, вставок или делеций, например, консервативных замен).

В еще одном варианте осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую, по меньшей мере, одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR или гипервариабельных петель из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи, имеющих аминокислотную последовательность, как указано в таблицах 2-5, 8-11, или последовательность, по существу гомологичную им (например, последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичную им и/или имеющую одну, две, три или более замен, вставок или делеций, например, консервативных замен).

В другом варианте осуществления, молекула нуклеиновой кислоты включает одну или несколько каркасных областей тяжелой цепи (например, любую из VHFW1 (тип a), VHFW1 (тип b), VHFW1 (тип c), VHFW1 (тип d), VHFW2 (тип a), VHFW2 (тип a′), VHFW2 (тип b), VHFW2 (тип c), VHFW2 (тип d), VHFW2 (тип e), VHFW3 (тип a), VHFW3 (тип b), VHFW3 (тип c), VHFW3 (тип d), VHFW3 (тип e) или VHFW4, или любой их комбинации, например, комбинации каркасов, как описано в настоящем документе) для любого из TA02, TC01, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или последовательности, по существу идентичной им. Например, молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, представленную в таблицах 6, 7, 12, 13, или последовательность, по существу идентичную ей (например,

последовательность, по меньшей мере, примерно на 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичную им, или отличающуюся не более чем на 3, 6, 15, 30 или 45 нуклеотидов от последовательностей, показанных в таблицах 6, 7, 12, 13).

В другом варианте осуществления, молекула нуклеиновой кислоты включает одну или несколько каркасных областей легкой цепи (например, любую из VLFW1 (типа a), VLFW1 (типа b), VLFW1 (типа c), VLFW1 (типа d), VLFW1 (типа e), VLFW1 (типа f), VLFW2 (типа a), VLFW2 (типа c), VLFW3 (типа a), VLFW3 (типа b), VLFW3 (типа c), VLFW3 (типа d), VLFW3 (типа e), VLFW3 (типа f), VLFW3 (типа g) или VLFW4, или любой их комбинации, например, комбинации каркасов, как описано в настоящем документе) для любого из E01, E02, E08, E14, E19, E20, E23, E24 или M1, как определено в таблицах 2-5, 8-11, или последовательности, по существу идентичной им. Например, молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, как указано в таблицах 6, 7, 12, 13, или последовательность, по существу идентичную ей (например, последовательность, по меньшей мере, примерно на 85%, 90%, 95%, 99% или более идентичную им или отличающуюся не более чем на 3, 6, 15, 30 или 45 нуклеотидов от последовательностей, показанных в таблицах 6, 7, 12, 13).

В другом варианте осуществления, молекула нуклеиновой кислоты включает одну или несколько каркасных областей тяжелой цепи и одну или несколько каркасных областей легкой цепи, как описано в настоящем документе. Каркасные области тяжелой и легкой цепи могут присутствовать в одном и том же векторе или в отдельных векторах.

В другом аспекте, заявка включает клетки-хозяева и векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе, или модифицированные для оптимизации кодонов в соответствии с известными способами. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в одном векторе или в отдельных векторах, присутствующих в одной и той же клетке-хозяине или в отдельной клетке-хозяине. Клетка-хозяин может быть эукариотической клеткой, например, клеткой млекопитающего, клеткой насекомого, дрожжевой клеткой, или прокариотической клеткой, например, E.coli. Например, клетка млекопитающего может быть культивируемой клеткой или клеточной линией. Примеры клеток млекопитающих включают лимфоцитарные клеточные линии

(например, NSO), клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки COS, ооциты и клетки трансгенного животного, например эпителиальные клетки молочной железы.

В одном аспекте, изобретение относится к описанному в настоящем документе способу получения молекулы антитела. Способ включает: получение антигена TMEM (например, антигена, содержащего, по меньшей мере, часть эпитопа TMEM); получение молекулы антитела, специфически связывающейся с полипептидом TMEM; и оценку того, связывается ли молекула антитела специфически с полипептидом TMEM, или оценку эффективности молекулы антитела в модулировании, например, ингибировании активности TMEM. Способ может дополнительно включать введение молекулы антитела субъекту, например, человеку или животному, отличному от человека.

В другом аспекте, изобретение относится к композициям, например фармацевтическим композициям, которые включают фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или стабилизатор и, по меньшей мере, одну из описанных в настоящем документе молекул анти-TMEM-антитела. В одном варианте осуществления, композиция, например, фармацевтическая композиция, включает комбинацию молекулы антитела и одного или нескольких агентов, например, терапевтического агента, или другой молекулы антитела, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления, молекула антитела конъюгирована с меткой или терапевтическим агентом.

Молекулы анти-TMEM антител, описанные в настоящем документе, могут ингибировать, снижать или нейтрализовать одну или несколько активностей IGFBP3, как указано выше. Таким образом, такие молекулы антител можно использовать для лечения или профилактики нарушений, при которых желательно ингибирование, снижение или нейтрализация IGFBP3-индуцированной активности у субъекта.

Применение молекул анти-TMEM антител

Настоящие антитела используются в способах лечения различных нарушений или состояний, таких как диабет, а также кишечных заболеваний пищеварительного тракта, синдрома мальабсорбции, воспалительного заболевания кишечника, кахексии, болезни Крона, язвенного колита, целиакии, диабетической энтеропатии.

Соответственно, в другом аспекте, представлен способ модуляции оси IGFBP3/TMEM219 у субъекта. Способ включает введение субъекту молекулы анти-TMEM антитела, описанной в настоящем документе (например, терапевтически эффективного количества молекулы анти-TMEM антитела), отдельно или в комбинации с одним или несколькими агентами или процедурами, так что ось IGFBP3/TMEM219 у субъекта модулируется. В одном варианте осуществления, молекула антитела ингибирует, снижает или нейтрализует или блокирует активность оси IGFBP3/TMEM219 у субъекта. Субъект может быть млекопитающим, например, приматом, предпочтительно, высшим приматом, например, человеком (например, пациентом, страдающим или имеющим риск возникновения описанного в настоящем документе нарушения). В одном варианте осуществления, субъект нуждается в ингибировании, снижении, нейтрализации или блокировании оси IGFBP3/TMEM219. В одном варианте осуществления, субъект страдает или подвергается риску возникновения описанного в настоящем документе нарушения, например, диабета или воспалительного заболевания кишечника (IBD), синдрома мальабсорбции, раздраженного кишечника, кахексии, целиакии, диабетической энтеропатии, как описано в настоящем документе.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Влияние вновь созданных анти-TMEM mAb на DSS-индуцированный колит у мышей. Экспериментальные сроки изучения DSS-индуцированного колита на мышах: мышам C57BL/6 вводят 2,5% DSS в питьевой воде в течение 5 дней и ежедневно внутрибрюшинно вводят анти-TMEM mAb в дозе 0,5 мг/мышь, начиная с 3 дней до индуцирования колита и до наступления эвтаназии в течение 7 дней после последнего введения DSS.

Фигура 2. (A) Индекс активности заболевания (DAI), система оценки, используемая для определения тяжести колита у мышей, и (B) гистологическая оценка представляет собой исследование, используемое для оценки тяжести и степени воспаления, интенсивности клеточного инфильтрата в слизистой оболочке, ее протяженности в подслизистых слоях, наличия эпителиальных поражений и регенерации слизистой, оценивают через 7 дней после последнего введения DSS в период заживления раны/начала хронической фазы. Значения

представляют собой средние значения ± СОС. *p≤0,05, **p≤0,01 по сравнению с группой DSS.

Фигура 3. Парафиновые срезы толстой кишки полученные при эвтаназии, т.е. через 7 дней после последнего введения DSS, окрашивают (A) по Май-Грюнвальду-Гимзе для гистологического исследования. (B) Апоптотические клетки определяют с помощью анализа TUNEL и с контрастным окрашиванием DAPI. (C) Пролиферацию клеток определяют с помощью анализа PCNA и с контрастным окрашиванием DAPI.

Фигура 4. Влияние недавно созданных анти-TMEM219 mAb на возникновение диабета у мышей с T1D. Экспериментальные сроки изучения мышей NOD.

Фигура 5. (A) Действие анти-TMEM219 mAb в профилактике развития диабета у мышей NOD в возрасте 22 недель, и (B) в сохранении уровня глюкозы в крови. Профилактика диабета, полученная при использовании анти-TMEM219 mAb, наблюдается у 100% мышей. *p < 0,05 по анализу Мантеля-Кокса к отсутствию лечения. Свободные от диабета мыши представляют собой нормогликемических мышей.

Уровень глюкозы в крови >250 мг/дл при трех последовательных измерениях определяет начало диабета. Мыши без диабета не меют уровень глюкозы в >250 мг/дл при трех последовательных измерениях.

Фигура 6. Серийные парафиновые срезы ткани поджелудочной железы полученные при эвтаназии, окрашивают H&E, и область островков и морфологию анализируют под микроскопом. (A) Показаны типовые изображения; оригинальное увеличение 20x. (B) Показаны оценки инсулита. В (B) степень клеточной инфильтрации оценивают по шкале от 0 до 4. Инсулит оценивают путем исследования минимум 30 островков на животное. *p<0,05 по критерию Манна-Уитни для всех к нелеченным.

Фигура 7. Серийные парафиновые срезы ткани поджелудочной железы, полученные при эвтаназии, готовят с иммуногистохимическим окрашиванием инсулина (коричневый цвет). Показаны типовые изображения; оригинальное увеличение 20X.

Фигура 8. Влияние анти-TMEM219 mAb на снижение экспрессии CASP8 в линии бета-клеток, подвергшихся воздействию IGFBP3.

Фигура 9. Влияние анти-TMEM219 mAb на снижение экспрессии CASP8 в линии бета-клеток, подвергшихся воздействию T1D сыворотки, обогащенной IGFBP3.

Фигура 10. Влияние анти-TMEM219 mAb в снижении экспрессии CASP8 в островках человека, подвергшихся воздействию IGFBP3.

Фигура 11. Влияние анти-TMEM219 mAb на снижение апоптоза в островках человека, подвергшихся воздействию IGFBP3.

Фигура 12. Влияние анти-TMEM219 mAb на снижение апоптоза в островках человека, подвергшихся воздействию сыворотки T1D.

Фигура 13. Влияние анти-TMEM219 mAb на снижении экспрессии CASP8 в линии бета-клеток, подвергшихся воздействию сыворотки T1D.

Фигура 14. Влияние анти-TMEM219 mAb на апоптоз линии бета-клеток.

Фигура 15. Влияние анти-TMEM219 mAb на экспрессию мРНК CASP8 в линии бета-клеток.

Фигура 16. Влияние недавно созданных анти-TMEM219 mAb на возникновение диабета в модели диабета на мышах. Экспериментальные сроки модели диабета с низкой дозой стрептозотоцина.

Фигура 17. Линейный график, показывающий уровень глюкозы в крови, измеренный у мышей B6, которым многократно вводят низкие дозы стрептозотоцина (ldSTZ, 50 мг/кг) и которых лечат анти-TMEM219 mAb или не лечат (n = 5).

Фигура 18. Уровень глюкозы в крови, измеренный через 60 минут во время IPGTT (1 г/кг) у мышей B6, которым вводят ld-STZ с/без анти-TMEM219 mAb на 10 день (n=5). *p<0,05, **p<0,01.

Фигура 19. Типовое окрашивание H&E в серийных срезах ткани островков поджелудочной железы, полученных от мышей B6, которым инъецируют ldSTZ и лечат анти-TMEM219 mAb или без них (n = 3). 20X исходное увеличение, масштабная линейка, 100 мкм.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антитела по изобретению специфически связываются с TMEM219 человека. Как обсуждается в настоящем документе, антитела по изобретению вместе называются «анти-TMEM или анти-TMEM219 антитела». Все такие антитела охватываются обсуждением в настоящем документе.

Соответствующие антитела можно использовать по отдельности или в комбинации в способах по изобретению.

Под «антителами, которые специфически связывают» TMEM219 подразумевается, что антитела не будут по существу перекрестно реагировать с другим, негомологичным полипептидом человека. Под «не будут по существу перекрестно реагировать» подразумевается, что антитело или его фрагмент имеют аффинность связывания с негомологичным белком, которая составляет менее 10%, более предпочтительно, менее 5% и еще более предпочтительно, менее 1% от аффинности связывания с TMEM219.

В различных вариантах осуществления, антитело, которое «специфически связывает» TMEM219, как используется в настоящем документе, включает антитела, которые связывают TMEM219 или его внеклеточную часть, такую как Ecto-TMEM, с KD менее примерно 1000 нМ, менее примерно 500 нМ, менее примерно 300 нМ, менее примерно 200 нМ, менее примерно 100 нМ, менее примерно 90 нМ, менее примерно 80 нМ, менее примерно 70 нМ, менее примерно 60 нМ, менее примерно 50 нМ, менее примерно 40 нМ, менее примерно 30 нМ, менее примерно 20 нМ, менее примерно 10 нМ, менее примерно 5 нМ, менее примерно 4 нМ, менее примерно 3 нМ, менее примерно 2 нМ, менее примерно 1 нМ или примерно 0,5 нМ при измерении с помощью устройства для интерферометрии биослоев Octet или в анализе поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием системы BIAcore™ (подразделение Biacore Life Sciences компании GE Healthcare, Piscataway, NJ), или анализов кинетического исключения, или любого известного в данной области техники способа.

Термин «антитело» в настоящем документе используется в самом широком смысле, известном в данной области техники, включая все полипептиды, описанные как антитела в (25), включенной в настоящий документ посредством ссылки.

Например, термин «антитело», используемый в настоящем документе, охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, моноспецифические и мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что фрагмент демонстрирует желаемую антигенсвязывающую активность

(антигенсвязывающие фрагменты). Этот термин имеет самое широкое значение, признанное в данной области техники, и включает все известные форматы, включая, помимо прочего, двухвалентные моноспецифические моноклональные антитела, двухвалентные биспецифические антитела, трехвалентные триспецифические антитела, фрагменты F(ab), фрагменты F(ab)'2, фрагменты scFv, диатела, однодоменные антитела, включая однодоменные антитела VHH верблюдовых, тандемные диатела и флекситела.

Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или, эквивалентно, «антигенсвязывающая часть» антитела и подобные, используемые в настоящем документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который содержит часть антитела и который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включающие манипуляции и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитело) или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химическим путем или с использованием методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или нескольких вариабельных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот, и так далее.

Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит, по меньшей мере, два разных вариабельных домена, где каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же антигене.

В конкретных вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент антитела содержит, по меньшей мере, один вариабельный домен, ковалентно

связанный, по меньшей мере, с одним константным доменом. Неограничивающие примерные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые могут быть найдены в антигенсвязывающем фрагменте антитела, включают: (i) VH- CH1; (ii) VH-CH2; (iii) VH-CH3; (iv) VH-CH1-CH2; (v) VH-CH1-CH2-CH3; (vi) VH- CH2-CH3; (vii) VH-CL; (viii) VL-CH1; (ix) VL-CH2; (x) VL-CH3; (xi) VL-CH1-CH2; (xii) VL-CH1-CH2-CH3; (xiii) VL-CH2-CH3; и (xiv) VL-CL. В любой конфигурации вариабельного и константного доменов, включая любую из типовых конфигураций, перечисленных выше, вариабельный и константный домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область в различных вариантах осуществления может состоять, по меньшей мере, из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними вариабельными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела может в различных вариантах осуществления содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из перечисленных выше конфигураций вариабельного и константного доменов в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами VH или VL (например, дисульфидной связью(ями)).

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела дополнительно включает однодоменные антитела.

Однодоменное антитело представляет собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного вариабельного домена антитела. В некоторых вариантах осуществления, однодоменное антитело происходит от вариабельного домена тяжелой цепи антитела верблюдовых (также называемого нанотелами или фрагментами VHH). В некоторых вариантах осуществления, однодоменное антитело представляет собой автономный вариабельный домен тяжелой цепи человека (aVH) или фрагменты VNAR, полученные от акул.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')2; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и

(vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченного пептида FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с трансплантированными CDR, диатела, триантела, тетратела, минитела, нанотела (например, одновалентные нанотела и двухвалентные нанотела), небольшие модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акул, также охватываются выражением «антигенсвязывающий фрагмент», используемым в настоящем документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит, по меньшей мере, один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или любую аминокислотную композицию, и обычно будет содержать, по меньшей мере, одну CDR, которая примыкает к или находится в рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен VH, ассоциированный с доменом VL, домены VH и VL могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры VH-VH, VH-VL или VL-VL. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен VH или VL.

Антитело или связывающая молекула по изобретению могут быть дополнительно связаны с активным веществом, предпочтительно с наночастицей или радионуклеотидом.

Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающая молекула» относится в самом широком смысле к молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. Примерами антигенсвязывающих молекул являются антитела, включая антигенсвязывающие фрагменты антител, и каркасные антигенсвязывающие белки.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к части антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывается с

антигенной детерминантой. Антигенсвязывающие фрагменты включают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, такие как scFv, которые способны специфически связываться с антигеном на клетке-мишени. В конкретном аспекте, антигенсвязывающий фрагмент способен направлять объект, к которому он присоединен, такой как клетка, в сайт-мишень.

Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты, способные к специфическому связыванию с антигеном клетки-мишени, включают каркасные антигенсвязывающие белки, как определено в настоящем документе ниже, например, связывающие домены, которые основаны на сконструированных повторяющихся белках или сконструированных повторяющихся доменах, таких как сконструированные белки с анкириновыми повторами (DARPins) (см. например, WO 2002/020565) или липокалины (антикалин).

Сконструированные белки с анкириновыми повторами (DARPins), которые получены из анкирина, представляют собой семейство белков, которые опосредуют присоединение интегральных мембранных белков к цитоскелету. Одиночный анкириновый повтор представляет собой мотив из 33 остатков, состоящий из двух альфа-спиралей и бета-витка. Их можно сконструировать для связывания различных антигенов-мишеней путем рандомизации остатков в первой альфа-спирали и бета-витке каждого повтора. Их интерфейс связывания можно увеличить, увеличив количество модулей (способ созревания аффинности). Дополнительные подробности см. в J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) иJ. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) и US20040132028.

В некоторых вариантах осуществления, антитела и антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем документе, изменены для увеличения или уменьшения степени гликозилирования антигенсвязывающего фрагмента. Гликозилированные варианты молекул могут быть легко получены путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создается или удаляется один или несколько сайтов гликозилирования. Когда антигенсвязывающая молекула содержит участок Fc, присоединенный к нему углевод может быть изменен. В одном аспекте, представлены варианты антигенсвязывающих молекул, имеющих углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или косвенно) к области Fc. Такие

варианты фукозилирования могут иметь улучшенную функцию ADCC, см., например, публикации патентов США №№ US 2003/0157108 (Presta, L.) или US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Дополнительные варианты антигенсвязывающих молекул по изобретению включают молекулы с расщепленными пополам олигосахаридами, например, в которых двуантенный олигосахарид, присоединенный к Fc-участку, расщеплен пополам с помощью GlcNAc. Такие варианты могут иметь пониженное фукозилирование и/или улучшенную функцию ADCC, см., например, WO 2003/011878 (Jean-Maret et al.); патент США № 6,602,684 (Umana et al.); и US 2005/0123546 (Umana et al.). Также представлены варианты, по меньшей мере, с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенным к области Fc. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию CDC и описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); и WO 1999/22764 (Raju, S.).

В некоторых вариантах осуществления, может быть желательно создать сконструированные с цистеином варианты антитела или антигенсвязывающей молекулы по изобретению, например, «тиоMAbs», в которых один или несколько остатков молекулы замещены цистеиновыми остатками. В конкретных вариантах осуществления, замещенные остатки находятся в доступных местах молекулы. Замещая эти остатки цистеином, реакционноспособные тиоловые группы располагаются в доступных участках антитела и могут быть использованы для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственного средства или фрагменты линкер-лекарственное средство, для создания иммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления, любой один или несколько из следующих остатков могут быть заменены цистеином: V205 (нумерация по Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи; и S400 (нумерация EU) области Fc тяжелой цепи. Сконструированные с цистеином антигенсвязывающие молекулы могут быть получены, как описано, например, в патенте США № 7521541.

В некоторых аспектах, антитело или антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем документе, могут быть дополнительно модифицированы, чтобы содержать дополнительные не белковые фрагменты, которые известны в данной области техники и легко доступны. Фрагменты, подходящие для дериватизации антитела или антигенсвязывающей молекулы,

включают, но не ограничиваются, ими водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропропиленгликоля, сополимеры пролипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликоль пропиональдегид может иметь преимущества в производстве из-за его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или не разветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться, и если присоединено более одного полимера, они могут быть одинаковыми или разными молекулами. Как правило, количество и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, можно определить на основе соображений, включая, но не ограничиваясь ими, конкретные свойства или функции антитела, которое необходимо улучшить, и того, будет ли производное антитела использоваться в терапии при определенных условиях, и т. д.

В другом аспекте предложены конъюгаты антитела и не белковой группы, которые можно селективно нагревать под воздействием излучения. В одном варианте осуществления, не белковая группа представляет собой углеродную нанотрубку (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). Излучение может иметь любую длину волны и включает, помимо прочего, длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают не белковую группу до температуры, при которой клетки, расположенные ближе к антитело-не белковой группе, погибают. В другом аспекте, могут быть получены иммуноконъюгаты антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе. «Иммуноконъюгат» представляет собой антитело, конъюгированное с одной или несколькими гетерологичными молекулами, включая, но не ограничиваясь ими, цитотоксический агент.

Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, желательно ли, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность. В некоторых вариантах осуществления, константная область представляет собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Изобретение охватывает, в различных вариантах осуществления, антитела, имеющие одну или несколько мутаций в шарнирной, CH2 или CH3 области, которые могут быть желательны, например, при продуцировании, для повышения выхода желаемой формы антитела. В некоторых вариантах осуществления, например, антитела, описанные в настоящем документе, содержат константную область IgG4 человека. В конкретных вариантах осуществления, константная область IgG4 имеет единственную аминокислотную замену в шарнирной области шарнира IgG4 человека, что снижает обмен плечами Fab (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит одну или несколько мутаций в константной области, которые увеличивают время полужизни в сыворотке, включая мутации, описанные в патентах США №№ 7,083,784, 8,323,962 и Dall'Aqua et al., *J. Biol. Chem.* 281(33):23514-23524 (2006); Hinton *et al.*, *J. Immunology* 176:346-356 (2006); Yeung *et al.*, *J. Immunology* 182:7663-7671 (2009); и Petkova *et al.*, *Intn'l Immunology*,18: 1759-1769 (2006), полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки.

Термин «антитело человека», используемый в настоящем документе, предназначен для включения антител, имеющих вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека, представленные в изобретении, могут, тем не менее, в различных вариантах осуществления включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом in vitro или соматической мутацией in vivo), например, в CDR, и, в некоторых вариантах осуществления, CDR3. Однако термин «антитело человека», используемый в настоящем документе, не

предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR получены из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, которые были привиты к каркасным последовательностям человека.

Термин «рекомбинантное антитело человека», используемый в настоящем документе, включает все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных средств, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описанного ниже), антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных антител человека (описанных ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), трансгенного по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res.20:6287-6295, полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления, такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу in vitro (или, когда используется животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу in vivo), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей VH и VL зародышевой линии человека и связаны с ними, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека in vivo.

«Выделенное антитело», как используется в настоящем документе, означает антитело, которое было идентифицировано, выделено и/или восстановлено, по меньшей мере, из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было выделено или удалено, по меньшей мере, из одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которой это антитело существует в природе или вырабатывается в природе, является «выделенным антителом». В различных вариантах осуществления, выделенное

антитело также включает антитело in situ внутри рекомбинантной клетки. В других вариантах осуществления, выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты, по меньшей мере, одной стадии очистки или выделения. В различных вариантах осуществления, выделенное антитело может по существу не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными областями антигена и могут оказывать разное биологическое действие. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно расположенными рядом аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцированный соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах, эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Анти-TMEM219 антитела, описанные в настоящем документе и пригодные для способов, представленных в настоящем документе, могут в различных вариантах осуществления включать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации можно легко установить путем сравнения описанных в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антитела.

Настоящее изобретение включает, в различных вариантах осуществления, антитела и способы, включающие применение антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые получены из любой из описанных в настоящем документе аминокислотных последовательностей, где одна или несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных и/или CDR

областей мутированы соответствующим(и) остатком(ами) последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело, или соответствующим(и) остатком(ами) другой последовательности зародышевой линии человека, или консервативной аминокислотной заменой соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в совокупности называются в настоящем документе «мутациями зародышевой линии»).

Могут быть сконструированы многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, все остатки каркаса и/или CDR в доменах VH и/или VL мутированы обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления, только некоторые остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутантные остатки, обнаруженные в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутантные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько остатков каркаса и/или CDR мутированы в соответствующие остатки другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело было получено изначально). Кроме того, антитела могут содержать любую комбинацию двух или нескольких мутаций зародышевой линии в каркасной области и/или областях CDR, например, где некоторые отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или заменяются соответствующим остатком другой последовательности зародышевой линии. После получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко проверить на наличие одного или нескольких желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические

биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), сниженная иммуногенность, и т.д. Применение антител и антигенсвязывающих фрагментов, полученных таким общим способом, охватывается настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также включает анти-TMEM219 антитела и способы, включающие использование анти-TMEM219 антител, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем документе, имеющиех одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает применение анти-IL-6R антител, имеющих аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т. д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем документе.

Термин «биоэквивалент», используемый в настоящем документе, относится к молекуле, имеющей аналогичную биодоступность (скорость и степень доступности) после введения в той же молярной дозе и в аналогичных условиях (например, при одном и том же пути введения), так что эффект в отношении как эффективности, так и безопасности, можно ожидать, что они будут по существу такими же, как у сравниваемой молекулы. Две фармацевтические композиции, содержащие анти-IGFBP3 антитело, являются биоэквивалентными, если они фармацевтически эквивалентны, что означает, что они содержат одинаковое количество активного ингредиента (например, антитела IGFBP3) в одной и той же дозированной форме, для одного и того же пути введения и удовлетворяют одинаковым или сопоставимым стандартам. Биоэквивалентность можно определить, например, путем исследования in vivo, сравнивающего фармакокинетический параметр для двух композиций. Параметры, обычно используемые в исследованиях биоэквивалентности, включают пиковую концентрацию в плазме (Cmax) и площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства в плазме от времени (AUC).

Изобретение в некоторых вариантах осуществления относится к антителам и способам, включающим введение субъекту антитела, которое

содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы: от SEQ ID NO:32 до SEQ ID NO:37 или от SEQ ID NO:88 до SEQ ID NO:95, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы: от SEQ ID NO:38 до SEQ ID NO:43 или от SEQ ID NO:96 до SEQ ID NO:103. В описании представлены фармацевтические композиции, содержащие такое антитело, и способы применения этих композиций.

Антитело вводят субъекту в различных вариантах осуществления в составе, включающем подходящие носители, эксципиенты и другие агенты для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и подобных свойств, и подходящем для внутривенной или подкожной инъекции.

Препараты для инъекций могут быть приготовлены общеизвестными способами. Например, препараты для инъекций могут быть приготовлены, например, растворением, суспендированием или эмульгированием антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используются, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные вещества и т. д., которые можно использовать в комбинации с соответствующим солюбилизирующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 20 или 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т. д. В качестве масляной среды используют например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизирующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Приготовленным таким образом препаратом для инъекций можно заполнить соответствующую ампулу.

Антитело по изобретению можно вводить субъекту с использованием любого приемлемого устройства или механизма. Например, введение можно осуществлять с помощью шприца и иглы или многоразовой шприц-ручки и/или автоинъектора. Способы по настоящему изобретению включают использование множества многоразовых шприц-ручек и/или автоинъекторов для введения антитела (или фармацевтического состава, содержащего антитело). Примеры

таких устройств включают, помимо прочего, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), и это лишь некоторые из них. Примеры одноразовых шприц-ручек и/или автоинжекторов, используемых для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но не ограничены ими, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), автоинъектор DAI® (SHL Group) и любой автоинъектор, включающий технологию PUSHCLICK™ (SHL Group), и это лишь некоторые из них.

В одном варианте осуществления, антитело вводят с помощью предварительно заполненного шприца. В другом варианте осуществления, антитело вводят предварительно заполненным шприцем, содержащим систему безопасности. Например, система безопасности предотвращает случайный укол иглой. В различных вариантах осуществления, антитело вводят с помощью предварительно заполненного шприца, содержащего систему безопасности ÈRIS™ (West Pharmaceutical Services Inc.). См. также патенты США №№ 5,215,534 и 9,248,242, полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки.

В другом варианте осуществления, антитело вводят с помощью автоинъектора. В различных вариантах осуществления, антитело вводят с помощью автоинъектора с технологией PUSHCLICK™ (SHL Group). В различных вариантах осуществления, автоинъектор представляет собой устройство, содержащее шприц, который позволяет вводить дозу композиции и/или антитела субъекту. См. также патенты США 9,427,531 и 9,566,395, полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки.

В соответствии с изобретением, «субъект» означает субъекта-человека или пациента-человека.

ПРИМЕРЫ

СПОСОБЫ

Рекомбинантные белки

Рекомбинантный IGFBP3 человека получают от Life Technologies (IGFBP3, Life Technologies, 10430H07H5). Ecto-TMEM219, представляющий собой внеклеточный домен рецептора TMEM219, получают через специализированную белковую службу Genescript. Белок, продуцируемый E. coli, имеет следующую аминокислотную последовательность:

Последовательность аминокислот Ecto-TMEM человеческого:

THRTGLRSPDIPQDWVSFLRSFGQLTLCPRNGTVTGKWRGSHVVGLLTTLN FGDGPDRNKTRTFQATVLGSQMGLKGSSAGQLVLITARVTTERTAGTCLYFSAVP GILPSSQPPISCSEEGAGNATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLTKLLTSEELALCGSR (SEQ ID NO: 125)

Аминокислотная последовательность Ecto-TMEM мыши:

THTTGLRSPDIPQDWVSFLRSFGQLSLCPMNETVTGTWQGPHVVGLLTTLN FGDGPDRNKTQTFQAKIHGSQIGLTGSSAGESVLVTARVASGRTPGTCLYFSGVPK VLPSSQPPISCSEEGVGNATLSPVMGEECVRVWSHERLVLTELLTSEELALCGS (SEQ ID NO: 126)

Развитие моноклональных антител из наивных библиотек фагового дисплея человека

Выбирают моноклональные анти-TMEM антитела из наивных библиотек фагового дисплея человека с использованием Ecto-TMEM219 человека (полученного из специализированной белковой службы Genescript) в качестве антигена для скрининга. Антиген Ecto-TMEM иммобилизуют на 96-луночных планшетах для ELISA либо путем прямой адсорбции, либо путем захвата поликлональными анти-Ecto-TMEM антителами. После промывки и блокирования лунок BSA, добавляют библиотеки антитела-фага. Библиотеки предварительно очищают от липких или перекрестно-реактивных антител-фагов.

Фаг, экспонирующий антиген-специфическое антитело, захватывают на поверхности планшета. После удаления не связанного/слабо связанного фага

путем промывания PBS-T, антигенспецифический фаг элюируют и амплифицируют. Это подмножество амплифицированной библиотеки снова выбирают для связывания с мишенью в более строгих условиях, т.е. число стадий промывки увеличивают для очистки несвязанного или слабосвязанного фага. Всего проводят три раунда селекции для обогащения антигенспецифического антитела-фага.

В конце процесса селекции, результат селекции подвергают скринингу на антигенспецифические антитела с помощью ELISA. Для этой цели, моноклональные антитела scFv получают из клонов, полученных в результате селекции. Затем их тестируют на специфическое связывание антигена с помощью ELISA. Выявлено 15 мишеньспецифических попаданий. 11 из них содержат уникальную последовательность CDR. Их клонируют в вектор экспрессии scFv-Fc млекопитающих, что приводит к генетическому слиянию scFv с Fc IgG4 человека.

6 из этих антител можно получить в формате scFv-Fc путем временной трансфекции клеток HEK293. Антитела очищают аффинной хроматографией (белок A) и повторно забуферивают в PBS. Концентрацию белка определяют с помощью УФ/видимой спектрометрии, и чистоту проверяют окрашиванием Кумасси.

Развитие моноклональных антител на основе гибридомы

Моноклональные анти-TMEM антитела идентифицируют с использованием трансгенных мышей, у которых соответствующие последовательности человеческого иммуноглобулина введены в геном животного с помощью генной инженерии, Trianni Mouse™ (Trianni).

Благодаря использованию такой технологии получают химерные моноклональные антитела, содержащие полный набор вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей человека и сохраняющие константные домены мыши.

По существу, две когорты мышей Trianni Mouse™ (когорта 1: адъювант ALD/MDP и когорта 2: адъювант SAS/ Ribi) иммунизируют Ecto-TMEM219 человека (специализированная белковая служба Genescript), две инъекции в неделю в течение 4 недель, затем продляют на 2 недели в течение одной инъекции в неделю. Затем у мышей, экспрессирующих антитела, выделяют лимфатические клетки (такие как B-клетки), такие клетки сливают с клеточной

линией миелоидного типа для получения бессмертных клеточных линий гибридомы, и такие клеточные линии гибридом подвергают скринингу и отбирают для идентификации клеточных линий гибридомы, которые продуцируют антитела, специфичные к Ecto-TMEM219 человека, с помощью ELISA. Линии клеток гибридомы, которые реакционноспособны в отношении представляющего интерес антигена, размножают. Секвенирование осуществляют путем выделения РНК с последующим секвенированием кДНК VH человека и VK человека с использованием способов секвенирования по Сэнгеру.

Антитела могут быть экспрессированы в клеточных линиях, отличных от клеточных линий гибридомы. Последовательности, кодирующие антитела, можно использовать для трансформации подходящей клетки-хозяина млекопитающего.

Способ экспрессии рекомбинантного белка в клетках CHO

Соответствующие кДНК TC01 и TM1 клонируют в векторную систему Evitria с использованием обычных (не основанных на ПЦР) методов клонирования для получения полностью человеческого IgG4 mAb. Синтезируют гены векторных плазмид Evitria. Плазмидную ДНК получают в условиях низкого содержания эндотоксинов на основе анионообменной хроматографии. Правильность последовательностей подтверждают с помощью секвенирования по Сэнгеру (до двух реакций секвенирования на плазмиду в зависимости от размера кДНК).

Для получения используют адаптированные к суспензии клетки CHO K1 (эвитрия). Затравку выращивают в среде eviGrow, среде определенного химического состава, не содержащей компоненты животного происхождения и не содержащей сыворотку. Клетки трансфицируют с помощью eviFect, запатентованного реагента для трансфекции, сделанного под Evitria, и после трансфекции клетки выращивают в среде eviMake, не содержащей животные компоненты и сыворотку, при 37°C и 5% CO2 в течение 7 дней. Супернатант собирают центрифугированием и последующей фильтрацией (фильтр 0,2 мкм).

Антитело очищают с использованием MabSelect™ SuRe™ с PBS по Дульбекко (Lonza BE17-512Q) в качестве промывочного буфера и 0,1 М глицина, pH 3,5, в качестве элюирующего буфера. Последующую эксклюзионную

хроматографию проводят на колонке HiLoad Superdex 200 пг с использованием конечного буфера в качестве рабочего буфера.

Мономерность определяют с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Agilent AdvanceBio SEC (300A 2,7 мкм 7,8 x 300 мм) и DPBS в качестве рабочего буфера со скоростью 0,8 мл/мин.

Последовательности 6 новых анти-TMEM антител из библиотек фагового дисплея человека представлены в таблицах 2-7 ниже.

Таблица 2: Последовательности VH CDR типовых антител

Антитело	CDR1	CDR2	CDR3
TA02	SYAIS (SEQ ID NO. 1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO. 2)	GDIAAAGRKGLPIYYMDV (SEQ ID NO. 3)
TC01	SYGI (SEQ ID NO. 4)	WISAYNGNTNYAQKLQG (SEQ ID NO. 5)	WGRWLAHDY (SEQ ID NO. 6)
TC02	SYAIS (SEQ ID NO. 1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO. 2)	PSGYYIYDAFDI(SEQ ID NO. 7)
TD01	SYGIS (SEQ ID NO. 8)	WISAYNGNTNYAQKLQG (SEQ ID NO. 5)	DLGWPDDY (SEQ ID NO. 9)
TE01	DYGMS (SEQ ID NO. 10)	GINWNGGSTGYADSVKG (SEQ ID NO. 11)	DRLRYCSSTSCYIPDY (SEQ ID NO. 12)
TG02	SYGIS (SEQ ID NO. 8)	WISAYNGNTNYAQKLQG (SEQ ID NO. 5)	VGSTYDFWSGAYYYYGMDV (SEQ ID NO. 13)

Таблица 3: Последовательности VL CDR типовых антител

Антитело	CDR1	CDR2	CDR3
TA02	QASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)	AASSLQS (SEQ ID NO. 15)	QQSYSTPT (SEQ ID NO. 16)
TC01	SGDKLGNKNAY (SEQ ID NO. 17)	QSTRRPS (SEQ ID NO. 18)	QAWDSSSGWEV (SEQ ID NO. 19)
TC02	GASQSVSSSYLA (SEQ ID NO. 20)	DASSRAT (SEQ ID NO. 21)	HQYNNWPRT (SEQ ID NO. 22)
TD01	SGSSSNIGSNYVY (SEQ ID NO. 23)	RNNQRPS (SEQ ID NO. 24)	AAWDDSLNGVV (SEQ ID NO. 25)
TE01	KSSQSVLDSSNNKNYVA (SEQ ID NO. 26)	WASTRES (SEQ ID NO. 27)	QQYYTTRWT (SEQ ID NO. 28)
TG02	RASQGIRNDLG (SEQ ID NO. 29)	DASNLET (SEQ ID NO. 30)	QQYDNLPLT (SEQ ID NO. 31)

Определение CDR также предоставляется с использованием инструмента аннотации с http://www.abysis.org/ на основе полных аминокислотных последовательностей VH и VL, как определено в таблицах 4, 5, 10 и 11.

Например, аминокислотная последовательность VH любого описанного в настоящем документе антитела вставляется в инструмент для аннотирования, и предоставляются последовательности CDR, определенные по Kabat.

Ниже показан пример со ссылкой на SEQ ID NO. 33 (VH TC01).

Таблица 3.1: Последовательности CDR, определенные по Kabat

Определение областей: Kabat

Область	Фрагмент последовательности	Остатки
HFR1	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID No. 127)	1 - 30
CDR-H1	SYGIS (SEQ ID No. 8)	31 - 35
HFR2	WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID No. 128)	36 - 49
CDR-H2	WISAYNGNTNYAQKLQG (SEQ ID No. 5)	50 - 66
HFR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR (SEQ ID No. 129)	67 - 98
CDR-H3	WGRWLAHDY (SEQ ID No. 6)	99 - 107
HFR4	WGQGTLVTVSS (SEQ ID No. 130)	108 - 118

Аминокислотная последовательность VH любого описанного в настоящем документе антитела может быть включена в инструмент для аннотирования, и представлены последовательности CDR, определенные IMGT.

Ниже показан пример со ссылкой на SEQ ID NO. 33 (VH TC01).

Таблица 3.2: Определенные IMGT последовательности CDR

Определение областей: IMGT

Область	Фрагмент последовательности	Остатки
HFR1	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS (SEQ ID No. 131)	1 - 25
CDR-H1	GYTFTSYG (SEQ ID No. 132)	26 - 33
HFR2	ISWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID No. 133)	34 - 50
CDR-H2	ISAYNGNT (SEQ ID No. 134)	51 - 58
HFR3	NYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC (SEQ ID No. 135)	59 - 96
CDR-H3	ARWGRWLAHDY (SEQ ID No. 136)	97 - 107
HFR4	WGQGTLVTVSS (SEQ ID No. 137)	108 - 118

Кроме того, аминокислотная последовательность VH любого описанного в настоящем документе антитела может быть вставлена в инструмент для аннотации, и представлены последовательности CDR, определенные как «все, рядом».

Ниже показан пример со ссылкой на SEQ ID NO. 33 (VH TC01).

Таблица 3.3: Все, рядом определенные последовательности CDR

Определение областей Все, рядом

Область	Определение	Фрагмент последовательности	Остатки
HFR1	Chothia	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS----- (SEQ ID No. 131)	1 - 25
	AbM	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS----- (SEQ ID No. 131)	1 - 25
	Kabat	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFT (SEQ ID No. 127)	1 - 30
	Contact	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TF-(SEQ ID No. 138)	1 - 29
	IMGT	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS----- (SEQ ID No. 131)	1 - 25
CDR-H1	Chothia	GYTFTSY---(SEQ ID No. 139)	26 - 32
	AbM	GYTFTSYGIS (SEQ ID No. 140)	26 - 35
	Kabat	-----SYGIS (SEQ ID No. 8)	31 - 35
	Contact	----TSYGIS (SEQ ID No. 141)	30 - 35
	IMGT	GYTFTSYG--(SEQ ID No. 132)	26 - 33
HFR2	Chothia	GISWVRQAPGQGLEWMGWI (SEQ ID No. 142)	33 - 51
	AbM	---WVRQAPGQGLEWMG-- (SEQ ID No. 128)	36 - 49
	Kabat	---WVRQAPGQGLEWMG--(SEQ ID No. 128)	36 - 49
	Contact	---WVRQAPGQGLE-----(SEQ ID No. 143)	36 - 46
	IMGT	-ISWVRQAPGQGLEWMGW-(SEQ ID No. 133)	34 - 50
CDR-H2	Chothia	-----SAYNGN---------(SEQ ID No. 144)	52 - 57
	AbM	---WISAYNGNTN-------(SEQ ID No. 145)	50 - 59
	Kabat	---WISAYNGNTNYAQKLQG (SEQ ID No. 5)	50 - 66
	Contact	WMGWISAYNGNTN------- (SEQ ID No. 146)	47 - 59
	IMGT	----ISAYNGNT--------(SEQ ID No. 134)	51 - 58
HFR3	Chothia	TNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCAR (SEQ ID No. 147)	58 - 98

	AbM	--YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCAR (SEQ ID No. 148)	60 - 98
	Kabat	---------RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCAR (SEQ ID No. 129)	67 - 98
	Contact	--YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYC—(SEQ ID No. 149)	60 - 96
	IMGT	-NYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYC—(SEQ ID No. 135)	59 - 96
CDR-H3	Chothia	--WGRWLAHDY (SEQ ID No. 6)	99 - 107
	AbM	--WGRWLAHDY (SEQ ID No. 6)	99 - 107
	Kabat	--WGRWLAHDY (SEQ ID No. 6)	99 - 107
	Contact	ARWGRWLAHD-(SEQ ID No. 150)	97 - 106
	IMGT	ARWGRWLAHDY (SEQ ID No. 136)	97 - 107
HFR4	Chothia	-WGQGTLVTVSS (SEQ ID No. 137)	108 - 118
	AbM	-WGQGTLVTVSS (SEQ ID No. 137)	108 - 118
	Kabat	-WGQGTLVTVSS (SEQ ID No. 137)	108 - 118
	Contact	YWGQGTLVTVSS (SEQ ID No. 151)	107 - 118
	IMGT	-WGQGTLVTVSS (SEQ ID No. 137)	108 - 118

Определение CDR предоставляется с использованием инструмента аннотации с http://www.abysis.org/ на основе полной VL аминокислоты TC01 (SEQ ID NO. 39).

Таблица 3.4: Все, рядом определенные последовательности CDR

Область	Определение	Фрагмент последовательности	Остатки
LFR1	Chothia	QAVLTQPPSVSVSPGQTASITC------(SEQ ID No. 152)	1 - 22
	AbM	QAVLTQPPSVSVSPGQTASITC------(SEQ ID No. 152)	1 - 22
	Kabat	QAVLTQPPSVSVSPGQTASITC------(SEQ ID No. 152)	1 - 22
	Contact	QAVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLG (SEQ ID No. 153)	1 - 28
	IMGT	QAVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGD--- (SEQ ID No. 154)	1 - 25
CDR-L1	Chothia	SGDKLGNKNAY--(SEQ ID No. 17)	23 - 33
	AbM	SGDKLGNKNAY--(SEQ ID No. 17)	23 - 33
	Kabat	SGDKLGNKNAY--(SEQ ID No. 17)	23 - 33
	Contact	------NKNAYWY (SEQ ID No. 155)	29 - 35
	IMGT	---KLGNKN----(SEQ ID No. 156)	26 - 31
LFR2	Chothia	--WYQQKPGQSPVLVMY (SEQ ID No. 156)	34 - 48

	AbM	--WYQQKPGQSPVLVMY (SEQ ID No. 156)	34 - 48
	Kabat	--WYQQKPGQSPVLVMY (SEQ ID No. 156)	34 - 48
	Contact	----QQKPGQSPV----(SEQ ID No. 157)	36 - 44
	IMGT	AYWYQQKPGQSPVLVMY (SEQ ID No. 158)	32 - 48
CDR-L2	Chothia	----QSTRRPS (SEQ ID No. 18)	49 - 55
	AbM	----QSTRRPS (SEQ ID No. 18)	49 - 55
	Kabat	----QSTRRPS (SEQ ID No. 18)	49 - 55
	Contact	LVMYQSTRRP-(SEQ ID No. 159)	45 - 54
	IMGT	----QS-----	49 - 50
LFR3	Chothia	-----GIPERFSASNSGNTATLTISGTQAMDE ADYYC (SEQ ID No. 160)	56 - 87
	AbM	-----GIPERFSASNSGNTATLTISGTQAMDE ADYYC (SEQ ID No. 160)	56 - 87
	Kabat	-----GIPERFSASNSGNTATLTISGTQAMDE ADYYC(SEQ ID No. 160)	56 - 87
	Contact	----SGIPERFSASNSGNTATLTISGTQAMD EADYYC (SEQ ID No. 161)	55 - 87
	IMGT	TRRPSGIPERFSASNSGNTATLTISGTQA MDEADYYC (SEQ ID No. 162)	51 - 87
CDR-L3	Chothia	QAWDSSSGWEV (SEQ ID No. 19)	88 - 98
	AbM	QAWDSSSGWEV (SEQ ID No. 19)	88 - 98
	Kabat	QAWDSSSGWEV (SEQ ID No. 19)	88 - 98
	Contact	QAWDSSSGWE- (SEQ ID No. 163)	88 - 97
	IMGT	QAWDSSSGWEV (SEQ ID No. 19)	88 - 98
LFR4	Chothia	-FGGGTKLTVL (SEQ ID No. 164)	99 - 108
	AbM	-FGGGTKLTVL (SEQ ID No. 164)	99 - 108
	Kabat	-FGGGTKLTVL (SEQ ID No. 164)	99 - 108
	Contact	VFGGGTKLTVL (SEQ ID No. 165)	98 - 108
	IMGT	-FGGGTKLTVL (SEQ ID No. 164)	99 - 108

Таблица 4: VH аминокислотные последовательности типовых антител	
Антитело	**АК из VH**
TA02	QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSNLRSEDTA VYYCARGDIAAAGRKGLPIYYMDVWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO. 32)

TC01	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARWGRWLAHDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 33)
TC02	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCASPSGYYIYDAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO. 34)
TD01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDLGWPDDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 35)
TE01	EVQLLESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKG LEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAAYYCAKDRLRYCSSTSCYIPDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 36)
TG02	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARVGSTYDFWSGAYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO. 37)

Таблица 5: VL аминокислотные последовательности типовых антител	
Антитело	**АК из VL**
TA02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY STPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 38)
TC01	QAVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNAYWYQQKPGQSPVL VMYQSTRRPSGIPERFSASNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSSSGWEVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO. 39)
TC02	ETTLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPGLAP RLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQY NNWPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO. 40)
TD01	QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAP KLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAA WDDSLNGVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO. 41)
TE01	DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSSNNKNYVAWFQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYTTRWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO. 42)
TG02	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPK LLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYD NLPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO. 43)

Таблица 6: VH нуклеотидные последовательности типовых антител	
Антитело	**ДНК из VH**
TA02	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAGGCCTG GGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTT CAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAA GGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGC AAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCG GACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAACCTGA

	GATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGATATA GCAGCAGCTGGTAGGAAAGGACTGCCCATCTACTACATGGACGT CTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO. 44)
TC01	CAAATCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTT ACCAGCTACGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAG GGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACA AACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGA CACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGA TCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGTGGGGTAGGT GGCTGGCTCATGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT CTCCTCA (SEQ ID NO. 45)
TC02	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTT CAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAA GGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGC AAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCG GACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGCCCAAGTGG TTATTATATTTATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAAT GGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO. 46)
TD01	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTT ACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAG GGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACA AACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGA CACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGA TCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCGGCTG GCCAGATGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA (SEQ ID NO. 47)
TE01	GAAGTGCAGTTGTTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT GATGATTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCACA GGTTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CTGAGGACACGGCTGCGTATTACTGTGCGAAAGATCGACTAAGA TATTGTAGTAGTACCAGCTGCTATATCCCTGACTACTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO. 48)
TG02	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTT ACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAG GGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACA AACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGA CACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGA TCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTAGGGAGCA CTTACGATTTTTGGAGTGGCGCCTACTACTACTACGGTATGGAC GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO. 49)

Таблица 7: VL нуклеотидные последовательности типовых антител	
Антитело	**ДНК из VL**
TA02	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATT AGCAACTACTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCC CATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTG TCAACAGAGTTACAGTACCCCTACTTTTGGCCAGGGGACCAAGC TGGAGATCAAA (SEQ ID NO. 50)
TC01	CAGGCAGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAG GACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGAAAT AAAAATGCTTATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGT ACTGGTCATGTATCAAAGTACCAGACGGCCCTCAGGGATCCCT GAGCGATTCTCTGCCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGA CCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTG TCAGGCGTGGGACAGCAGTAGTGGATGGGAGGTATTCGGCGG AGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO. 51)
TC02	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCGGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCTGG CGCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAGCAGGGCCACTGG CATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTC ACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTA TTACTGTCACCAGTATAATAACTGGCCTAGGACGTTCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO. 52)
TD01	CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCG GGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACAT CGGAAGTAATTATGTATACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACG GCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGG GGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCC TCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATT ATTATTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTGTGGTATTC GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO. 53)
TE01	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCGGACTCCCTGGCTGTGTCTC TGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGT TTTGGACAGCTCCAACAATAAAAATTATGTCGCTTGGTTCCAGC AGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCCTCT ACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGTT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGA AGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATACTACTCGGTG GACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO. 54)
TG02	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATT AGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCC TAAACTCCTGATCTACGATGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCC

	CATCAAGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTC ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTG TCAACAGTATGATAACCTCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACC AAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO. 55)

Последовательности 8 новых анти-TMEM антител на основе гибридомы представлены в таблицах 8-13 ниже.

Таблица 8: VH CDR Последовательности типовых антител			
Антитело	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**
TE02.1	GFTFSRHG (SEQ ID NO. 56)	IWYDGRNK (SEQ ID NO. 57)	AREGITMVRGVIPLFDY (SEQ ID NO. 58)
TE02.2	GFTFSRHG (SEQ ID NO. 56)	IWYDGRNK (SEQ ID NO. 57)	AREGITMVRGVIPLFDY (SEQ ID NO. 58)
TE02.3	GFTFSRHG (SEQ ID NO. 56)	IWYDGRNK (SEQ ID NO. 57)	AREGITMVRGVIPLFDY (SEQ ID NO. 58)
TE03	GFTFSRYG (SEQ ID NO. 59)	IWYDGSYK (SEQ ID NO. 60)	ARFGILTGYYFDY (SEQ ID NO. 61)
TE04	GFTFSRHG (SEQ ID NO. 56)	IWYDGRNK (SEQ ID NO. 57)	AREGITMVRGVIPLFDY (SEQ ID NO. 58)
TE07	GFTFSSYA (SEQ ID NO. 62)	ISGSGYST (SEQ ID NO. 63)	AKGKVGPTYAFDL (SEQ ID NO. 64)
TE10	GFTFSSYG (SEQ ID NO. 65)	IWYDGSNK (SEQ ID NO. 66)	AREGRGMDV (SEQ ID NO. 67)
TM1	GFTFSTYG (SEQ ID NO. 68)	IWYDGYNK (SEQ ID NO. 69)	EGWFGKLLSALDI (SEQ ID NO. 70)

Таблица 9: VL CDR последовательности типовых антител			
Антитело	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**
TE02.1	SGHSSYA (SEQ ID NO. 71)	LNSDGSH (SEQ ID NO. 72)	QTWGTGMLC (SEQ ID NO. 73)
TE02.2	SGHSSYA (SEQ ID NO. 71)	LNSDGSH (SEQ ID NO. 72)	QTWGTGMLF (SEQ ID NO. 74)
TE02.3	SGHSSYA (SEQ ID NO. 71)	LNSDGSH (SEQ ID NO. 72)	QTWGTGMLW (SEQ ID NO. 75)
TE03	SGHSSYA (SEQ ID NO. 71)	LNSDGSH (SEQ ID NO. 72)	QTWGTGCC (SEQ ID NO. 76)
TE04	SGSVSTSYN (SEQ ID NO. 77)	STN (SEQ ID NO. 78)	VLYMGSGII (SEQ ID NO. 79)
TE07	SGSVSTSYY (SEQ ID NO. 80)	STN (SEQ ID NO. 78)	VLYMGSGTCC (SEQ ID NO. 81)
TE10	SGHSSYI (SEQ ID NO. 82)	LEGSGSY (SEQ ID NO. 83)	ETWDSNTPHAV (SEQ ID NO. 84)
TM1	QGIRND (SEQ ID NO. 85)	PAS (SEQ ID NO. 86)	LQDYNYPFT (SEQ ID NO. 87)

Таблица 10: VH аминокислотные последовательности типовых антител	
Антитело	**АК из VH**
TE02.1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRHGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGRNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRV EDTAVYYCAREGITMVRGVIPLFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 88)
TE02.2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRHGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGRNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRV EDTAVYYCAREGITMVRGVIPLFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 89)
TE02.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRHGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGRNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRV EDTAVYYCAREGITMVRGVIPLFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 90)
TE03	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGSYKYYADSIKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTALYYCARFGILTGYYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 91)
TE04	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRHGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGRNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRV EDTAVYYCAREGITMVRGVIPLFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 92)
TE07	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGEG LEWVSGISGSGYSTYSADSVKGRFTIFKDNSKNTLYLQINSLRAEDT AVYYCAKGKVGPTYAFDLWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO. 93)
TE10	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREGRGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO. 94)
TM1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGIHWVRQAPGKGL EWVAVIWYDGYNKYYVDSVKGRFTISRDNSENTVYLQMNSLRTED TAVYYCAREGWFGKLLSALDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO. 95)

Таблица 11: VL аминокислотные последовательности типовых антител	
Антитело	**АК из VK**

TE02.1	QFVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSGHSSYAIAWHHQQPEKGPR YLMKLNSDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYY CQTWGTGMLCFGGGTQLTALR (SEQ ID NO. 96)
TE02.2	QFVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSGHSSYAIAWHHQQPEKGPR YLMKLNSDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYY CQTWGTGMLFGGGTQLTALR (SEQ ID NO. 97)
TE02.3	QFVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSGHSSYAIAWHHQQPEKGPR YLMKLNSDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYY CQTWGTGMLWFGGGTQLTALR (SEQ ID NO. 98)
TE03	QVVLTQSPPASASLGASVKLTCTLSSGHSSYAIAWHQQQPEKGPR YLMKLNSDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYY CQTWGTGCCFGGGTQLTALR (SEQ ID NO. 99)
TE04	QTVVTQESSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSYNPSWYQQTPGQA PRTLIYSTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCVL YMGSGIIFGSGTKVTVL (SEQ ID NO. 100)
TE07	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSYYPSWYQQTPGQA PRTLIYSTNTRSSGVPERFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCVL YMGSGTCCFGGGTQLTALR (SEQ ID NO. 101)
TE10	QPVLTQSSSASASLGSSVKLTCTLSSGHSSYIIAWHQQQPGKAPRY LMKLEGSGSYNKGSGVPDRFSGSSSGADRYLTISNLQFEDEADYY CETWDSNTPHAVFGGGTQLTAL (SEQ ID NO. 102)
TM1	VIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYLQKPGKAPEL LIYPASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYN YPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 103)

Таблица 12: VH нуклеотидные последовательности типовых антител	
Антитело	**ДНК из VH**
TE02.1	CAGGTCCAACTCGTCGAGAGCGGAGGAGGAGTCGTCCAACCCGG AAGGAGCTTGCGGCTATCATGCGCGGCATCCGGCTTCACATTTTC CCGGCACGGGATGCACTGGGTCAGGCAAGCACCCGGCAAGGGG CTAGAATGGGTCGCGGTCATCTGGTATGATGGAAGGAACAAATAC TATGCCGACTCAGTCAAGGGGCGATTTACAATTTCGCGAGACAAC TCCAAGAATACGCTATACCTGCAAATGAACTCGCTGAGGGTCGAG

	GACACGGCGGTTTATTACTGCGCGAGGGAGGGGATAACTATGGT CAGAGGAGTCATTCCGCTATTTGACTATTGGGGGCAGGGTACCTT AGTCACGGTCTCGAGC (SEQ ID NO. 104)
TE02.2	CAGGTCCAACTCGTCGAGAGCGGAGGAGGAGTCGTCCAACCCGG AAGGAGCTTGCGGCTATCATGCGCGGCATCCGGCTTCACATTTTC CCGGCACGGGATGCACTGGGTCAGGCAAGCACCCGGCAAGGGG CTAGAATGGGTCGCGGTCATCTGGTATGATGGAAGGAACAAATAC TATGCCGACTCAGTCAAGGGGCGATTTACAATTTCGCGAGACAAC TCCAAGAATACGCTATACCTGCAAATGAACTCGCTGAGGGTCGAG GACACGGCGGTTTATTACTGCGCGAGGGAGGGGATAACTATGGT CAGAGGAGTCATTCCGCTATTTGACTATTGGGGGCAGGGTACCTT AGTCACGGTCTCGAGC (SEQ ID NO. 105)
TE02.3	CAGGTCCAACTCGTCGAGAGCGGAGGAGGAGTCGTCCAACCCGG AAGGAGCTTGCGGCTATCATGCGCGGCATCCGGCTTCACATTTTC CCGGCACGGGATGCACTGGGTCAGGCAAGCACCCGGCAAGGGG CTAGAATGGGTCGCGGTCATCTGGTATGATGGAAGGAACAAATAC TATGCCGACTCAGTCAAGGGGCGATTTACAATTTCGCGAGACAAC TCCAAGAATACGCTATACCTGCAAATGAACTCGCTGAGGGTCGAG GACACGGCGGTTTATTACTGCGCGAGGGAGGGGATAACTATGGT CAGAGGAGTCATTCCGCTATTTGACTATTGGGGGCAGGGTACCTT AGTCACGGTCTCGAGC (SEQ ID NO. 106)
TE03	CAGGTCCAACTCGTTGAATCCGGGGGGGGAGTCGTCCAACCGGG GAGAAGCCTGCGGCTAAGCTGCGCGGCTTCGGGATTCACATTCT CTCGATACGGGATGCACTGGGTCAGGCAAGCACCGGGGAAGGG CTTGGAATGGGTCGCCGTCATATGGTACGACGGATCATATAAATA TTATGCTGACTCTATAAAGGGGCGATTCACGGTTAGCCGAGACAA CTCCAAAAACACGCTATACCTGCAAATGAACTCACTGCGAGCTGA AGATACGGCGCTATATTATTGCGCCCGATTCGGAATCCTGACCGG ATATTATTTTGACTACTGGGGGCAGGGTACCCTAGTCACGGTCTC GAGC (SEQ ID NO. 107)
TE04	CAGGTCCAACTCGTCGAGAGCGGAGGAGGAGTCGTCCAACCCGG AAGGAGCTTGCGGCTATCATGCGCGGCATCCGGCTTCACATTTTC CCGGCACGGGATGCACTGGGTCAGGCAAGCACCCGGCAAGGGG

	CTAGAATGGGTCGCGGTCATCTGGTATGATGGAAGGAACAAATAC TATGCCGACTCAGTCAAGGGGCGATTTACAATTTCGCGAGACAAC TCCAAGAATACGCTATACCTGCAAATGAACTCGCTGAGGGTCGAG GACACGGCGGTTTATTACTGCGCGAGGGAGGGGATAACTATGGT CAGAGGAGTCATTCCGCTATTTGACTATTGGGGGCAGGGTACCTT AGTCACGGTCTCGAGC (SEQ ID NO. 108)
TE07	GAAGTCCAACTGCTGGAATCGGGCGGGGGGCTGGTCCAACCCG GAGGATCATTGAGGCTATCATGCGCCGCTTCCGGCTTTACATTTA GCTCATACGCAATGTCATGGGTCCGACAAGCTCCGGGGGAGGGA CTGGAATGGGTCTCTGGGATTTCGGGCTCTGGATACTCCACATAT AGCGCGGACTCAGTCAAGGGGAGATTCACGATTTTTAAGGATAAC TCCAAGAATACATTATATCTGCAAATAAACTCGCTGAGGGCGGAG GATACCGCCGTTTATTACTGCGCCAAAGGGAAAGTCGGGCCAACT TACGCATTCGACCTATGGGGGCAGGGTACCATGGTCACGGTCTC GAGC (SEQ ID NO. 109)
TE10	CAAGTGCAACTCGTGGAATCGGGCGGAGGGGTGGTGCAACCGG GAAGATCACTGCGACTATCATGCGCCGCATCGGGATTTACATTTA GCAGCTACGGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCACCCGGAAAAGG GCTGGAATGGGTCGCGGTGATTTGGTACGATGGCTCGAATAAATA CTATGCTGACTCGGTGAAGGGCCGATTCACAATCTCGCGGGACA ACTCCAAAAACACACTATATCTGCAAATGAACTCACTGCGGGCGG AGGATACCGCGGTATATTACTGCGCGAGGGAGGGGCGCGGAATG GATGTATGGGGGCAGGGTACCACGGTGACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO. 110)
TM1	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCATCTGGATTCACCTTCA GTACCTATGGCATACACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGATATAATAAATACT ATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATT CCGAGAACACGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAACCGAG GACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAAGGATGGTTCGGGAAA TTATTATCCGCTCTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC GTCTCTTCA (SEQ ID NO. 111)

Таблица 13: VL нуклеотидные последовательности типовых антител	
Антитело	**ДНК из VL**
TE02.1	GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCT GACCCTGAAAGGCGTCCAGTGTCAATTTGTGCTGACGCAATCG CCATCGGCTAGTGCATCACTGGGGGCGAGCGTTAAATTGACAT GCACGCTATCGAGCGGACACTCATCATATGCCATTGCATGGCA CCACCAACAACCGGAAAAGGGGCCACGATATCTAATGAAGCTG AACTCTGACGGATCGCATTCGAAAGGGGATGGGATTCCCGACC GATTCTCGGGAAGCAGCAGCGGAGCTGAAAGATATTTAACGATA TCATCGCTGCAATCGGAGGATGAAGCTGACTACTACTGCCAAAC TTGGGGAACGGGGATGCTATGCTTCGGAGGAGGCACACAATTG ACGGCCCTTGGACAACCG (SEQ ID NO. 112)
TE02.2	GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCT GACCCTGAAAGGCGTCCAGTGTCAATTTGTACTGACGCAAAGC CCAAGCGCGAGCGCATCGCTGGGAGCATCCGTCAAGCTCACAT GCACGCTATCATCGGGCCATTCAAGCTATGCCATAGCATGGCAT CACCAACAACCGGAGAAGGGACCTCGATATCTGATGAAGCTGA ATAGCGACGGCTCCCACTCAAAGGGGGACGGAATCCCGGATAG ATTTTCGGGCTCATCAAGCGGAGCGGAGCGATATCTCACGATCT CTAGCCTGCAAAGCGAGGATGAGGCCGACTACTACTGCCAAAC ATGGGGGACGGGAATGCTATTCGGAGGAGGCACGCAACTGAC GGCGCTGGGGCAACCA (SEQ ID NO. 113)
TE02.3	GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCT GACCCTGAAAGGCGTCCAGTGTCAATTTGTGCTGACGCAATCAC CATCGGCTTCGGCGAGCCTGGGGGCATCTGTCAAGCTGACATG CACGCTGAGCTCCGGGCATTCATCATATGCCATCGCATGGCAT CACCAACAACCCGAGAAGGGACCACGATATCTCATGAAGCTAAA CTCCGACGGATCGCATTCGAAGGGGGATGGAATACCCGACCGA TTTTCGGGATCATCGAGCGGGGCGGAGAGATATTTGACGATCT CCTCTCTGCAAAGCGAGGACGAGGCGGACTACTATTGCCAAAC CTGGGGCACGGGAATGCTATGGTTTGGAGGAGGCACACAACTG ACGGCGCTGGGCCAACCG (SEQ ID NO. 114)

TE03	GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCT GACCCTGAAAGGCGTCCAGTGTCAAGTAGTCCTGACTCAAAGC CCCCCGGCGAGCGCATCATTGGGGGCGAGCGTCAAGCTGACA TGCACGCTATCGAGCGGGCACTCTAGCTACGCGATAGCATGGC ACCAACAACAACCGGAAAAGGGACCCCGATACTTGATGAAATTA AATAGCGACGGATCGCACTCTAAGGGAGACGGAATACCTGATA GATTTAGCGGGAGCTCATCGGGGGCGGAGAGATACTTGACGAT TAGCTCACTGCAATCGGAGGATGAGGCGGACTACTATTGCCAA ACATGGGGGACGGGATGCTGCTTCGGAGGAGGCACGCAACTG ACCGCATTGGGACAACCA (SEQ ID NO. 115)
TE04	GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCT GACCCTGAAAGGCGTCCAGTGTCAAACCGTGGTGACACAAGAA TCAAGTTTTAGCGTATCGCCGGGAGGGACGGTGACGCTGACCT GCGGGCTATCATCTGGATCGGTATCAACATCCTACAATCCGAGC TGGTATCAACAAACGCCCGGACAAGCGCCACGAACCCTGATAT ATTCGACAAATACCCGATCATCTGGGGTGCCGGATAGATTTTCC GGCTCGATTCTGGGAAACAAGGCTGCGCTGACGATAACCGGAG CTCAAGCCGACGATGAGAGCGATTATTATTGCGTGCTATACATG GGGAGCGGGATTATATTCGGATCTGGAACGAAAGTCACGGTGC TAGGACAACCG (SEQ ID NO. 116)
TE07	GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCT GACCCTGAAAGGCGTCCAGTGTCAAACGGTCGTCACGCAAGAG CCATCCTTCTCGGTCTCGCCGGGGGGGACGGTCACACTGACAT GCGGGCTGAGCTCGGGATCGGTCTCAACGAGCTACTACCCGAG CTGGTATCAACAAACACCGGGGCAAGCACCGCGGACGCTGATA TATTCCACAAATACACGGAGCTCCGGTGTCCCGGAGAGATTCTC GGGATCAATACTGGGGAACAAGGCGGCTCTGACGATAACCGGA GCCCAAGCGGATGACGAATCGGACTATTACTGCGTCCTATACAT GGGCTCCGGCACATGCTGCTTTGGAGGAGGCACACAACTGACG GCGCTGGGACAACCT (SEQ ID NO. 117)
TE10	GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCT GACCCTGAAAGGCGTCCAGTGTCAGCCGGTTTTGACGCAATCT AGCAGCGCATCCGCTAGTCTTGGAAGCTCCGTGAAGCTGACAT

	GCACACTATCATCGGGGCATTCCTCCTACATAATTGCATGGCAT CAACAACAACCCGGCAAGGCCCCGAGATACTTAATGAAACTGG AAGGATCGGGATCATATAACAAAGGATCGGGGGTGCCGGATAG ATTTAGCGGATCTAGCTCTGGGGCTGACCGATACCTGACGATCT CTAATCTGCAATTTGAGGACGAGGCCGATTACTACTGCGAAACA TGGGATAGCAACACCCCACACGCGGTATTTGGAGGAGGCACCC AATTGACCGCGCTAGGCCAACCA (SEQ ID NO. 118)
TM1	GTCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATT AGAAATGATTTAGGCTGGTATCTGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTGAGCTCCTGATCTATCCTGCATCCAGTTTACAAAGTGGGGTC CCGTCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTAC TGTCTACAAGATTACAATTACCCGTTCACTTTTGGCCAGGGGAC CAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO. 119)

Дополнительные антитела

Продуцирование IgG

Аминокислотные последовательности обратно транслируют в ДНК и кодон-оптимизируют для экспрессии HEK. Оптимизированные последовательности ДНК химически синтезируют и клонируют в вектор экспрессии IgG4 человека (мутант S228P L235E). Получают ДНК для трансфекции и используют для временной трансфекции клеток HEK. Продуцированные антитела очищают из супернатанта культуры HEK с помощью аффинной хроматографии (белок A). Концентрацию белка определяют с помощью УФ/видимой спектрометрии, и чистоту проверяют с помощью восстановительного анализа SDS-PAGE.

Таблица 14: VH CDR Последовательности типовых антител			
Антитело	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**
TC03	SYGI (SEQ ID NO. 4)	WISAYNGNTNYAQKL QG (SEQ ID NO. 5)	WGRWLAHDY (SEQ ID NO. 6)
TC04	SYGI (SEQ ID NO. 4)	WISAYNGNTNYAQKL QG (SEQ ID NO. 5)	WGRWLAHDY (SEQ ID NO. 6)
TC05	SYGI (SEQ ID NO. 4)	WISAYNGNTNYAQKL QG (SEQ ID NO. 5)	WGRWLAHDY (SEQ ID NO. 6)

Таблица 15: VL CDR Последовательности типовых антител			
Антитело	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**
TC03	SGDKLGNKNAY (SEQ ID NO. 17)	QSTRRPS (SEQ ID NO. 18)	QAWLSSSGWEV (SEQ ID NO. 166)
TC04	SGDKLGNKNAY (SEQ ID NO. 17)	QSTRRPS (SEQ ID NO. 18)	QAWDSSSGWEV (SEQ ID NO. 167)
TC05	SGDKLGNKNAY (SEQ ID NO. 17)	QSTRRPS (SEQ ID NO. 18)	QAWDSSSGWEV (SEQ ID NO. 19)

Таблица 16: VH аминокислотные последовательности типовых антител	
Антитело	**АК из VH**
TC03	QIQLVQSGAEVKQPGASVSVSCAASGYTFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSD DTAVYYCARWGRWLAHDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 168)
TC04	QIQLVQSGAEVKQPGASVSVSCAASGYTFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSD DTAVYYCARWGRWLAHDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 169)
TC05	QIQLVQSGAEVKQPGASVSVSCAASGYTFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSD DTAVYYCARWGRWLAHDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 170)

Таблица 17: VL аминокислотные последовательности типовых антител	
Антитело	**АК из VL**
TC03	QAVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNAYWYQQKPGQSPVL VMYQSTRRPSGIPERFSASNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWL SSSGWEVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO. 171)
TC04	QAVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNAYWYQQKPGQSPVL VMYQSTRRPSGIPERFSASNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQAWD SSSGWEVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO. 172)
TC05	QAVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNAYWYQQKPGQSPVL VMYQSTRRPSGIPERFSASNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSSSGWEVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO. 173)

Таблица 18: VH нуклеотидные последовательности типовых антител	
Антитело	**ДНК из VH**
TC03	CAGATCCAGTTGGTGCAAAGTGGGGCTGAGGTAAAGCAGCCGG GTGCAAGTGTGTCCGTAAGTTGTGCAGCCAGTGGCTACACCTTT ACTAGTTACGGAATTTCATGGGTGCGGCAAGCTCCCGGTCAGG GATTGGAATGGATGGGATGGATTTCAGCATACAACGGGAACACA AATTACGCTCAAAAATTGCAGGGTCGAGTTACCATGACTACAGA CACGTCTACGTCTACAGCTTACATGGAACTTTCCAGCCTGCGGT CCGACGACACCGCAGTTTATTATTGCGCCCGCTGGGGGAGATG

	GCTCGCGCATGACTACTGGGGGCAGGGCACGCTGGTTACCGTT TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGC CCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAAC GTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG AGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGA GTTCGAGGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA CTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGG AGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACACAGAAGAGTCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA (SEQ ID NO. 174)
TC04	CAGATCCAGTTGGTGCAAAGTGGGGCTGAGGTAAAGCAGCCGG GTGCAAGTGTGTCCGTAAGTTGTGCAGCCAGTGGCTACACCTTT ACTAGTTACGGAATTTCATGGGTGCGGCAAGCTCCCGGTCAGG GATTGGAATGGATGGGATGGATTTCAGCATACAACGGGAACACA AATTACGCTCAAAAATTGCAGGGTCGAGTTACCATGACTACAGA CACGTCTACGTCTACAGCTTACATGGAACTTTCCAGCCTGCGGT CCGACGACACCGCAGTTTATTATTGCGCCCGCTGGGGGAGATG GCTCGCGCATGACTACTGGGGGCAGGGCACGCTGGTTACCGTT TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGC CCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAAC GTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG AGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGA GTTCGAGGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA CTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACC

	AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGG AGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACACAGAAGAGTCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA (SEQ ID NO. 175)
TC05	CAGATCCAGTTGGTGCAAAGTGGGGCTGAGGTAAAGCAGCCGG GTGCAAGTGTGTCCGTAAGTTGTGCAGCCAGTGGCTACACCTTT ACTAGTTACGGAATTTCATGGGTGCGGCAAGCTCCCGGTCAGG GATTGGAATGGATGGGATGGATTTCAGCATACAACGGGAACACA AATTACGCTCAAAAATTGCAGGGTCGAGTTACCATGACTACAGA CACGTCTACGTCTACAGCTTACATGGAACTTTCCAGCCTGCGGT CCGACGACACCGCAGTTTATTATTGCGCCCGCTGGGGGAGATG GCTCGCGCATGACTACTGGGGGCAGGGCACGCTGGTTACCGTT TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGC CCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAAC GTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG AGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGA GTTCGAGGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA CTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGG AGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACACAGAAGAGTCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA (SEQ ID NO. 176)

Таблица 19: VL нуклеотидные последовательности типовых антител	
Антитело	**ДНК из VH**
TC03	CAGGCGGTGCTTACTCAGCCCCCAAGTGTGTCTGTTTCCCCCGGT CAGACTGCGTCTATAACCTGCTCCGGGGATAAACTCGGCAACAAG AATGCGTACTGGTACCAACAGAAGCCGGGACAGAGCCCAGTCTT GGTCATGTACCAATCCACCCGGAGACCTAGCGGCATTCCAGAGC GCTTTAGTGCATCTAATTCTGGCAATACGGCGACGTTGACCATCA GTGGTACACAAGCGATGGACGAGGCAGATTACTACTGTCAGGCAT GGCTGTCATCATCCGGGTGGGAGGTGTTTGGCGGCGGAACAAAA

	CTCACTGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCACCAAGTGTCACTCTG TTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTG GTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGC CTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACC ACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG CTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCT ACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACA GTGGCCCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID NO. 177)
TC04	CAGGCCGTCTTGACTCAACCACCCTCCGTTAGTGTCTCCCCCGGC CAGACGGCGAGTATCACCTGTAGTGGTGATAAGCTGGGCAATAA GAATGCTTACTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAGAGCCCAGTGCT GGTGATGTATCAGTCTACAAGACGACCTAGCGGCATCCCAGAAAG GTTTTCTGCCAGCAATTCTGGCAATACGGCGACGCTGACTATTAG TGGCACACAAGCAGAGGATGAGGCGGACTATTACTGCCAAGCAT GGGACAGTAGTAGTGGTTGGGAAGTCTTCGGGGGCGGCACTAAG CTCACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCACCAAGTGTCACTCTG TTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTG GTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGC CTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACC ACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG CTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCT ACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACA GTGGCCCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID NO. 178)
TC05	CAAGCTGTATTGACACAACCTCCTAGTGTCAGTGTAAGCCCTGGT CAAACTGCCTCCATTACTTGCTCTGGCGACAAGCTCGGAAATAAG AACGCGTACTGGTACCAACAGAAGCCCGGACAGTCACCTGTGCTT GTTATGTATCAAAGCACCAGGAGACCTTCAGGGATACCAGAAAGG TTTAGTGCGTCTAATTCCGGGAATACCGCGACACTGACGATAAGC GGCACTCAGGCTATGGACGAAGCGGATTACTACTGTCAGGCATG GGATTCATCATCAGGTTGGGAAGTATTCGGGGGCGGTACAAAATT GACGGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCACCAAGTGTCACTCTGTT CCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGG TGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCT GGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCAC CACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTA TCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACA GCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG GCCCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID NO. 179)

Таблица 20: Аминокислотные последовательности константной области	
Константная область	**АК**
Тяжелая цепь IgG4 человека P01861.1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV

	FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO:120)
Тяжелая цепь IgG2 человека P01859	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT YTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO. 121)
Легкая цепь человека, лямбда 1 P0CG04	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO. 122)
Легкая цепь человека, лямбда 2 P0DOY2	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO. 123)
Легкая цепь человека, каппа P01834	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO. 124)

Все исследования проводят с использованием полностью человеческих антител IgG4.

Пример 1. Измерение аффинности

Анализ на основе Octet BLI

Антитела обладают высокой аффинностью к мишени, TMEM. Измерения аффинности связывания проводят с использованием прибора Octet (Octet

BMIA), который представляет собой платформу биослойной интерферометрии (BLI) на основе анализа биомолекулярных взаимодействий. Для проведения анализа, моноклональное антитело-мишень (30 мкг/мл в PBS) иммобилизуют с помощью Fc на биодатчиков захвата Fc анти-мышиного IgG (AMC) или захвата Fc анти-человеческого IgG (AMC) измеряли биосенсоры и взаимодействие с антигеном, Ecto-TMEM219 человека и мыши (специализированная белковая служба Genescript) при 150 нМ.

Результаты измерения аффинности анти-TMEM mAb для мишени Ecto-TMEM219 человека и мыши представлены в таблице 21.

Таблица 21: Измерение аффинности типовых антител

Антитело	**hEcto-TMEM KD (M)**	**mEcto-TMEM KD (M)**
TC01	$2x10^{-8}$	$3x10^{-8}$
TM1	$<10^{-12}$	$<10^{-12}$
TE08	$<10^{-12}$	Не проводилось
TE09	$<10^{-12}$	Не проводилось
ТЭ10	$<10^{-12}$	Не проводилось

Недавно созданные анти-TMEM mAb демонстрируют хорошую аффинность связывания антигена человека с KD ниже $2x10^{-8}$ M. Антитела также проявляют перекрестную реактивность с мышами. Эти данные подтверждают, что мышей можно считать подходящим видом животных для тестирования моноклональных антител во время доклинической разработки.

Измерение активности связывания антител с помощью ELISA

Активность связывания очищенного IgG4 (TC03, TC04, TC05) с рекомбинантным белком Ecto-TMEM измеряют с помощью ELISA. Коротко, Ecto-TMEM разводят в PBS до 5 мкг/мл и наносят на 96-луночные планшеты для ELISA (100 мкл/лунку) в течение 1 ч при КТ. После блокировки и промывки планшетов, в планшеты добавляют серию разведений антитела и инкубируют в течение 1 ч при КТ. После промывания планшетов, связанные антитела определяют с помощью вторичного анти-человеческого-Fc HRP-конъюгированного антитела. После еще одной стадии промывки проводят реакцию TMB, останавливают серной кислотой и измеряют оптическую

плотность. На основании показаний поглощения рассчитывают EC50 насыщающих антител.

EC50 анти-TMEM mAb для мишени Ecto-TMEM219 человека представлены в таблице 22.

Таблица 22: EC50 типовых антител

Антитело	**EC50 hEcto-TMEM (нг/мл)**
TC03	64,7
TC04	89,8
TC05	79,1

Пример 2: Эффективность анти-TMEM mAb в мышиной модели IBD после внутрибрюшинного (в/б) введения

Модель колита, вызванного декстраном сульфатом натрия (DSS) у мышей C57BL/6J, является проверенной моделью на животных для оценки, и для подтверждения противовоспалительных и ранозаживляющих свойств препаратов при IBD. DSS (пероральное введение в питьевой воде) вызывает сильную диарею с последующим воспалением. Эта модель хорошо охарактеризована, надежна, воспроизводима и принята регулирующими органами. [*См., например,* Eichele and Kharbanda, “Dextran sodium sulfate colitis murine model: an indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel disease pathogenesis,” *World J. Gastroenterol.* 23(33):6016-6028 (2017)]. Это исследование проводят на мышах C57BL/6J. На этом конкретном генетическом фоне у мышей развивается острый колит при анализе через 3 дня после последнего введения DSS или хроническое воспаление при анализе через 7 дней после последнего введения DSS.

Противовоспалительное и ранозаживляющее действие оценивают на клиническом и гистологическом уровнях с использованием подтвержденной клинической оценки, индекса активности заболевания (DAI) (таблица 23) и утвержденной оценки для гистологического анализа (таблица 24).

Животные

Самцов мышей C57BL/6J поставляют Charles River Laboratories, l'Arbresle, France. Мышей содержат при температуре 20±5°C и дают воду и пищу без ограничения. Все экспериментальные протоколы выполняют в аккредитованных

учреждениях в Институте Пастера из Лилля в соответствии с государственными инструкциями.

Создание модели DSS-индуцированного колита у мышей и лечение

Острый колит индуцируют путем кормления мышей 2,5% (масс./об.) DSS (45 кДа; TDB Consultancy AB, Uppsala, Sweden, номер партии DB001-41), растворенным в питьевой воде, в течение 5 дней. Мышей случайным образом делят на пять групп: контрольная группа; DSS + носитель; DSS + Хумира (адалимумаб) 0,3 мг на мышь (Abbvie, 1108722), DSS + TM1 0,5 мг на мышь и DSS + TC01 0,5 мг на мышь. Чтобы оценить влияние анти-TMEM mAb на DSS-индуцированный острый колит у мышей, C57BL/6J, мышей ежедневно лечат внутрибрюшинным введением указанной дозы анти-TMEM mAb, начиная с 3 дней до индуцирования колита, и продолжают до эвтаназии через 7 дней после последнего введения DSS. Экспериментальные сроки модели животных описаны на фигуре 1.

Терапевтические свойства TMEM mAb сравнивают со свойствами положительного контроля Хумира (адалимумаб), который одобрен для лечения как болезни Крона, так и язвенного колита. (Taghipour N. et al Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2016;9(1):45-52).

Поскольку мышиная модель DSS требует, чтобы каждое из антител - TMEM mAb и положительный контроль Хумира - перекрестно реагировало с мышиным ортологом родственного ему антигена человека (TMEM219 и TNFα, соответственно), относительная эффективность у людей не может быть оценена.

Клиническая оценка

Во всех группах ежедневно регистрируют массу мышей, консистенцию стула и наличие крови в стуле. Оценки индекса активности заболевания (DAI) основаны на изменениях массы тела, консистенции стула и геморрагическом кровотечении в соответствии со стандартной системой оценки. Эти параметры оценивают по шкале, описанной в таблице 23. Данные DAI представлены как средняя оценка этих параметров, получаемая ежедневно. Животных умерщвляют путем смещения шейных позвонков под анестезией. При эвтаназии, толстую кишку тщательно рассекают и измеряют массу и размер толстой кишки. Наличие скрытой крови (OB) регистрируют гемоккульттестом.

Таблица 23: Параметры, оцениваемые по шкале DAI		
Индекс активности заболевания (DAI) (0-5)	**Параметры**	**Оценки**
	Потеря веса	0: нет; 1: <10%; 2: ≥10%
	Консистенция стула	0: обычный; 1: мягкий; 2: диарея
	Наличие крови	0: отсутствие; 1: присутствие

Как показано на фиг. 2A, через семь дней после последнего введения DSS оценка DAI значительно увеличился по сравнению со здоровой контрольной группой (группой, получавшей только носитель) в группе мышей DSS, получавших носитель (значение p = 0,0012), что указывает на тяжесть колита. Значительное снижение показателя DAI зарегистрировано у мышей с колитом, получавших TCO1 (значение p = 0,002), TM1 (значение p = 0,05) и Хумира (значение p = 0,02), по сравнению с мышами DSS, получавшими только носитель. Этот результат указывает на сильный противовоспалительный эффект вновь созданных анти-TMEM mAb.

Оценка гистологических поражений толстой кишки

Для оценки уровня воспаления и регенерации тканей, образцы толстой кишки заливают в парафин и анализируют. Для гистологической оценки, срезы тканей толстой кишки (4 мкм) окрашивают по Май-Грюнвальд-Гимза и оценивают. Многопараметрическая оценка (от 0 до 18), как описано в Dieleman et al. 1998 (таблица 24), проводят два исследователя вслепую. При гистологическом исследовании оценивают выраженность и степень воспаления, выраженность клеточного инфильтрата в слизистой оболочке, его распространение в подслизистых слоях, наличие поражений эпителия и регенерацию тканей.

Образцы толстой кишки, залитые парафином, дополнительно исследуют для выявления апоптоза с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания опосредованного дезоксинуклеотидилтрансферазой дезоксиуридинтрифосфата, (TUNEL) с использованием набора для анализа TUNEL (Sigma, ref 11684795910) в соответствии с протоколом производителя. Способ TUNEL является эффективным методом измерения фрагментов ДНК, образующихся в результате апоптотической активации внутриклеточных эндонуклеаз.

В то же время, для определения уровня пролиферации клеток проводят иммунофлуоресцентное окрашивание ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) с использованием набора для анализа PCNA (Novus, NB600-1331) в соответствии с протоколом производителя. PCNA представляет собой белок, связанный с клеточным циклом, который максимально повышен в конце G1 и S-фазе пролиферирующих клеток.

Срезы контрастируют ядерным окрашиванием с использованием DAPI. Локализованную флуоресценцию обнаруживают с помощью флуоресцентной микроскопии.

Таблица 24: Многопараметрическая система оценки для гистологической оценки поражения толстой кишки

Параметр	Оценка	Описание
Тяжесть воспаления	0	Отсутствует
	1	Легкое
	2	Умеренное
	3	Тяжелое
Распространенность	0	Отсутствует
	1	Слизистая оболочка
	2	Слизистая и подслизистая оболочка
	3	Трансмуральная
Регенерация	4	Нет восстановления тканей
	3	Поверхностный эпителий не интактный
	2	Регенерация с истощением крипт
	1	Почти полная регенерация
	0	Полная регенерация или нормальная ткань
Повреждение крипт	0	Отсутствует
	1	Повреждена 1/3 от исходной
	2	Повреждены 2/3 от исходной
	3	Интактный только поверхностный эпителий
	4	Вся крипта и эпителий потеряны
Доля вовлечения	1	1-25%
	2	26-50%
	3	51-75%

Таблица 24: Многопараметрическая система оценки для гистологической оценки поражения толстой кишки		
Параметр	Оценка	Описание
	4	76-100%

Как показано на фиг. 2B, через семь дней после последнего введения DSS гистологический показатель в каждой группе количественно оценивают на срезах, окрашенных по Май-Грюнвальд-Гимза (фиг. 3A). Устойчивое и значительное воспаление толстой кишки по-прежнему регистрируется на гистологическом уровне в группах мышей DSS, получавших носитель, по сравнению со здоровой контрольной группой без колита (значение p = 0,002). После внутрибрюшинного введения TC01 в дозе 0,5 мг/мышь наблюдается значительное улучшение (значение p=0,01) уровня воспаления и регенерации слизистой оболочки на гистологическом уровне по сравнению с мышами с колитом, получавшими носитель. Кроме того, в/б введение TM1 в дозе 0,5 мг/мышь показывает улучшение уровня воспаления и регенерации слизистой оболочки на гистологическом уровне по сравнению с мышами с колитом, получавшими носитель.

TC01 и TM1 ингибируют апоптоз клеток кишечника, вызванный DSS, у мышей, как показано на срезах ткани толстой кишки, окрашенных с помощью набора для окрашивания TUNEL, способа обнаружения фрагментации ДНК, возникающей во время апоптоза (фиг. 3B). Срезы контрастируют DAPI, чтобы обеспечить ядерное окрашивание. TUNEL-положительные клетки в группах TC01 и TM1 ниже по сравнению с группой DSS.

Экспрессию PCNA ингибирована в группе мышей, получавших DSS, что указывает на тяжесть колита. В то время как в группе, получавшей TC01 и TM1, экспрессия PCNA в толстой кишке сохраняется и сравнима с экспрессией в контрольной группе, не получавшей DSS, как показано на срезах ткани толстой кишки, окрашенных с помощью набора для окрашивания PCNA (фиг. 3C).

Срезы контрастируют DAPI, чтобы обеспечить ядерное окрашивание.

Статистический анализ

Все сравнения анализируют с использованием пермутационного критерия для двух независимых образцов. Статистические данные рассчитывают с использованием GraphPad Prism версии 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Различия считаются статистически значимыми, если значение p составляет ≤0,05.

Пример 3: Эффективность анти-TMEM mAb в мышиной модели T1D после внутрибрюшинного (в/б) введения

Животные

Самок мышей с диабетом (NOD) без ожирения (в возрасте 10 недель) получают от Charles River Laboratories, Calco, Varese, Italy (инвентарный № 613). За всеми мышами обеспечивают уход и используют в соответствии с Законом Италии об уходе за животными № 116/1992 и Директивой Совета Европейского сообщества EEC/609/86.

Отслеживание и лечение диабета

Явный диабет (наиболее запущенная стадия, характеризующаяся повышенной концентрацией глюкозы в крови натощак и классическими симптомами) определяется как уровень глюкозы в крови выше 250 мг/дл при трех последовательных измерениях. Гликемию контролируют два раза в неделю. Созданы следующие группы лечения:

1) Не леченная

2) Ecto-TMEM219 0,1 мг/день (в/б) в течение 10 дней.

3) Анти-TMEM219 TM1 0,5 мг/день (в/б) в течение 10 дней.

4) Анти-TMEM219 TC01 0,5 мг/день (в/б) в течение 10 дней.

Ecto-TMEM и антитело растворяют в PBS.

В каждую группу лечения включено N=10 мышей. Лечение начинают, когда мышам исполняется 10 недель на 1 день. За мышами наблюдают до 22-недельного возраста. Мышей берут для исследования при оценке диабета или на 22 неделе. Образцы плазмы и поджелудочной железы собирают для анализа ex vivo. Сроки эксперимента описаны на фигуре 1.

Оценка инсулита и гистопатология островков поджелудочной железы

Оценку инсулита проводят на фиксированных формалином, залитых в парафин, окрашенных гематоксилином и эозином (H&E) и инсулином срезах поджелудочной железы толщиной 5 мкм, как описано ранее (Vergani A et al. Diabetes 2010; Ben Nasr M et al. Sci Transl Med 2017). Оценку инсулита проводят на окрашенных гематоксилином и эозином (H&E) срезах поджелудочной железы. Оценку от 0 до 4 присваивает на основе инфильтрации островков опытный

патологоанатом. Оценки инсулита ранжируют следующим образом: 0 степень, нормальные островки; 1 степень, легкая мононуклеарная инфильтрация (25%) по периферии; 2 степень, инфильтрировано 25–50% островков; 3 степень, (инфильтрировано 50% островков); 4 степень, островки полностью инфильтрированы без остаточной паренхимы. По меньшей мере, 30 островков на группу анализируют и объединяют из срезов, полученных от разных мышей.

Статистический анализ

Данные представлены как среднее значение и стандартная ошибка среднего (СОС), если не указано иное. Статистическую значимость различий тестируют с помощью двустороннего t-критерия (критерий Манна-Уитни). Заболеваемость сахарным диабетом среди различных групп анализируют с помощью логарифмического критерия (Мантель-Кокс). Статистический анализ проводят с использованием GraphPad Prism версии 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Все статистические тесты проводят на уровне значимости 5%.

Как показано на фигурах 4 и 5, авторы изобретения оценивают, предотвращает ли 10-дневное введение вновь созданных анти-TMEM219 mAb развитие клинического диабета у мышей NOD, мышиной модели, селективной для изучения аутоиммунного диабета 1 типа (T1D). Примечательно, что анти-TMEM219 mAb поддерживают уровень глюкозы в крови под контролем с течением времени и эффективны для профилактики возникновения диабета в модели мышей T1D NOD. Интересно, что 100% мышей, получавших антитела TM1 и TC01, не болели диабетом на 22 неделе по сравнению с 50% нелеченных контролей ($p<0,05$ для всех к нелеченным).

Затем срезы ткани поджелудочной железы мышей NOD, полученные от нелеченных мышей, мышей, получавших TM1, получавших TC01 и получавших Ecto-TMEM219, анализируют на инфильтрацию островков (инсулит), площадь и морфологию островков (фиг. 6A) и окрашивание инсулином (фиг. 7). Группы, получавшие TM1 и TC01, показывают хорошую морфологию островков, кроме того, у мышей, получавших TM1, площадь слегка увеличивается, что позволяет предполодить, что лечение анти-TMEM mAb предотвращает разрушение островков, обеспечивая нормальную функцию бета-клеток. Более того, мыши, получавшие TM1 и TC01, показали хорошо сохранившуюся положительность к инсулину по сравнению с нелеченным контролем, что еще раз подтверждает,

что функция островков сохранена. Действительно, инфильтрация островков у мышей, получавших лечение, поразительно уменьшается по сравнению с нелеченными мышами, что подтверждает защитную роль антител (фиг. 7).

Затем настоящие данные показывают эффективность анти-TMEM моноклональных антител для профилактики и/или лечения диабета.

Пример 4: Недавно полученные анти-TMEM219 моноклональные антитела ингибируют апоптоз в линии бета-клеток человека

Чтобы подтвердить, что недавно созданные анти-TMEM219 моноклональные антитела могут предотвращать проапоптотическое действие IGFBP3 на экспрессирующие TMEM219 клетки поджелудочной железы, их дополнительно тестируют in vitro на линии бета-клеток Betalox-5. Активации CASP8, вызванной действием IGFBP3, противодействуют недавно созданные анти-TMEM219 mAb с почти 30% снижением CASP8. Более того, воздействие на бета-клетки объединенной сыворотки T1D, обогащенной IGFBP3, увеличивает экспрессию CASP8, и анти-TMEM219 mAb способно уравновесить этот эффект, снижая CASP8, по меньшей мере, на 30%, тем самым поддерживая положительное действие этих недавно созданных моноклональных анти-TMEM219 антител при профилактике апоптоза бета-клеток поджелудочной железы (фиг. 8 и 9).

Пример 5: Недавно полученные анти-TMEM219 моноклональные антитела ингибируют апоптоз в островках человека

Чтобы подтвердить, что недавно созданные анти-TMEM219 моноклональные антитела могут предотвращать проапоптотическое действие IGFBP3 на клетки, экспрессирующие TMEM219, в поджелудочной железе, их дополнительно тестируют in vitro на островках человека (Celprogen). Активации CASP8, а также апоптозу, индуцированному воздействием IGFBP3, противодействуют вновь созданные анти-TMEM219 mAb (фиг. 10 и 11) со снижением CASP8 на 40% и апоптоза на 30%. Интересно, что воздействие на островки человека объединенной сыворотки T1D, естественно обогащенной IGFBP3, увеличивает экспрессию CASP8 и апоптоз, и анти-TMEM219 mAb способно уравновесить этот эффект, уменьшая как CASP8, так и апоптоз почти на 50%, тем самым поддерживая положительные эффекты недавно созданного

анти-TMEM219 моноклонального антитела при профилактике апоптоза островков (фиг.12 и 13).

Пример 6: Недавно созданные анти-TMEM219 моноклональные антитела не токсичны для бета-клеток.

Чтобы продемонстрировать, что вновь созданные анти-TMEM219 моноклональные антитела не активируют нисходящую передачу сигналов TMEM219, тем самым вызывая апоптоз клеток в отсутствие лигирования IGFBP3, проводят два основных анализа. Во-первых, демонстрируют, что бета-клетки, обработанные анти-TMEM219, не подвергаются апоптозу по сравнению с клетками, зараженными IGFBP3, который вызывает почти 30% увеличение гибели клеток (фигура 14). Затем оценивают экспрессию мРНК CASP8 и демонстрируют активацию в бета-клетках, культивируемых с IGFBP3, как и ожидалось (почти 70%), в то время как CASP8 остается неизменной в бета-клетках, культивируемых с анти-TMEM219 (фиг. 15). Эти данные в целом подтверждают отсутствие какого-либо токсического/апоптотического действия анти-TMEM219 mAb.

Пример 7: Действие анти-TMEM219 mAb в модели диабета, индуцированного стрептозотоцином, с гибелью бета-клеток

Далее проверяют действие фармакологической блокады IGFBP3/TMEM219 с помощью анти-TMEM219 моноклональных антител на второй модели разрушения бета-клеток и диабета, многократных низких дозах стрептозотоцина (ldSTZ, 50 мг/кг в течение 5 дней).

Химически индуцированный диабет с инъекцией стрептозотоцина используют для оценки воздействия таргетной стратегии, прежде всего, на массу бета-клеток. Это связано с развитием легкого воспаления, но без возникновения аутоиммунного ответа, подобного наблюдаемому у мышей NOD. Следовательно, успех соединения в сохранении уровня глюкозы в крови заключается главным образом в сохранении массы бета-клеток от повреждения и в поддержании секреции инсулина.

Стрептозотоцин индуцирует гибель бета-клеток, как это наблюдается при диабете, при введении по низкодозовой схеме 50 мг/кг в течение 5 дней подряд, и диабет/гипергликемия обычно развиваются в течение первых 2 недель после введения (фигура 16). Поэтому вводят низкие дозы STZ в течение 5 дней мышам

B6, которые одновременно получают анти-TMEM219 моноклональные mAb в дозе 0,5 мг/день в течение 10 дней. Лечение анти-TMEM219 mAb успешно сохраняет уровни глюкозы в крови у леченных мышей по сравнению с нелеченными животными (фигура 17), с улучшением также уровня глюкозы в крови, обнаруженным через 60 минут во время внутрибрюшинного теста на толерантность к глюкозе (IPGTT) (фигура 18). Морфологический анализ также показывает, что количество и площадь островков хорошо сохранены у животных, получавших анти-TMEM219 mAb, по сравнению с нелеченными мышами (фигура 19). В целом, это подтверждает, что анти-TMEM219 может сохранять массу бета-клеток и поддерживать уровень глюкозы в крови также в модели разрушения бета-клеток, тем самым подчеркивая преимущество этой стратегии в защите островков от потери и дисфункции бета-клеток, вызванных диабетом.

Анти-TMEM219 антитела, такие как TC01, эффективно защищают бета-клетки от повреждения и предотвращают их потерю, дополнительно сохраняя их способность отвечать на стимуляцию глюкозой. Кроме того, в островках мышей, леченных анти-TMEM219 TC01, воспаления не обнаружено, что подтверждает защитное действие на морфологию островков.

СПОСОБЫ ДЛЯ ПРИМЕРОВ 4-7

Рекомбинантные белки и интервенционные исследования

Рекомбинантный IGFBP3 человека (Life Technologies, 10430H07H5), 50 нг/мл (IGFBP3) и Ecto-TMEM219, 130 нг/мл добавляют к культурам в день +1 из культуры мини-кишок.

Вновь полученные анти-TMEM219 моноклональные антитела добавляют в молекулярном отношении 1:1 по сравнению с IGFBP3 в концентрации 10 мкг/мл.

Линия бета-клеток (Beta-lox5)

Клетки культивируют с DMEM 10% FBS, 0,02% BSA, 15 мМ HEPES, NEA 1x, 1 г/л глюкозы, PEN/STREP. Клетки обычно высевают в лунки диаметром 35 мм с плотностью 10000 клеток/лунку. Клетки пассируют при 80% конфлюентности. Клетки культивируют в течение 3 дней с/без рекомбинантных белков/антител, как описано в разделе «Рекомбинантные белки и интервенционные исследования».

Островки человека

Панкреатические островки Лангеранса человека (#35002-04), выделенные у здоровых субъектов, также приобретают из коммерческого источника (Celprogen, Torrance, CA) и культивируют со стандартной средой и 10% FBS в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы имитировать диабетические состояния, человеческую диабетическую сыворотку, полученную при установленном T1D (n=5/группа), добавляют вместо обычного FBS в концентрации 10% к линиям островков/бета-клеток человека.

Гибель островков/бета-клеток

Для оценки апоптоза/гибели клеток в очищенных островках человека и в линиях бета-клеток используют фотометрический иммуноферментный анализ (Roche Diagnostics GmbH, 11544675001, Mannheim, Germany), который количественно определяет in vitro связанные с гистонами фрагменты ДНК после индуцированного клеточного стресса на лизаты клеточной цитоплазмы и супернатанты клеток.

Исследования диабета, индуцированного STZ

Диабет химически индуцируют инъекцией низкой дозы стрептозотоцина (50 мг/кг, вводят в/б; Sigma Aldrich S0130) в течение 5 дней подряд, и гликемию контролируют в течение следующих 15 дней. Контрольной группе, состоящей из мышей B6 дикого типа, также вводят низкие дозы стрептозотоцина и соответственно контролируют. Анти-TMEM219 mAb и Ecto-TMEM219 также вводят в/б с 0 по 10 день в дозе 0,5 мг/день и 0,1 мг/день, соответственно, и гликемию контролируют в течение следующих 15 дней. В конце проводят внутрибрюшинный тест на толерантность к глюкозе (IPGTT) путем инъекции глюкозы 1 кг/г мышам после голодания в течение ночи и контролируют гликемию через 0, 30, 60 и 120 минут.

Статистический анализ

Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего (СОС). Статистическую значимость различий тестируют с помощью двустороннего t-критерия. Значимость между двумя группами определяют с помощью двустороннего непарного критерия Стьюдента. Для множественных сравнений используют тест ANOVA с поправкой Бонферрони. Графики создают

с использованием GraphPad Prism версии 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Все статистические тесты проводят при уровне значимости 5%.

ССЫЛКИ

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Baxter RC. J Cell Commun Signal. 2013;7(3):179-89.

2. Oh Y, et al., Prog Growth Factor Res. 1995;6(2-4):503-12.

3. Ingermann AR, et al. JBC. 2010;285(39):30233-46.

4. D'Addio F, et al. Cell stem cell. 2015;17(4):486-98.

5. Brennand K, and Melton D. J. of cellular and molecular med.. 2009;13(3):472-87.

6. Yi P, Park JS, and Melton DA. Cell. 2014;159(3):467-8.

7. Ben Nasr M, et al., Pharmacological res.: the official journal of the Italian Pharmacological Society. 2015;98:31-8.

8. Keenan HA, et al. Diabetes. 2010;59(11):2846-53.

9. Meier JJ, et al., Diabetologia. 2005;48(11):2221-8.

10. Atkinson MA, et al., Diabetes care. 2015;38(6):979-88.

11. Nguyen KH, et al., Endocrinology. 2011;152(6):2184-96.

12. Yakar S, et al., FASEB J. 2009;23(3):709-19.

13. Drogan D, et al., Am J Epidemiol. 2016;183(6):553-60.

14. Peet A, et al., Eur J Endocrinol. 2015;173(2):129-37.

15. Kaplan GG. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015;12(12):720-7.

16. Cui S, and Chang PY. World J Gastroenterol. 2016;22(31):7099-110.

17. Yancu D, et al., J Gastroenterol Hepatol. 2017;32(1):146-53.

18. Jung P, et al., Nature Medecine 2011;17:1225-1227.

20. George MJ, et al., Curr Diab Rep 2013;13(1):72-80.

21. Marsha JD. Am Health Drug Benefits 2011; 4(5): 312-322

22. Dhingra AK et al., Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem. 2015;14(2):81-97.

23. Pithadia AB, SunitaJ. Pharmacoligal rep 2011; 63: 629-642

24. Zhe Wang, et al., Expert Opin Drug Deliv. 2010 Feb;7(2):159-71

25. Sumit G, Wei W, Tsutomu and Satoshi O, Antibodies 2013; 2: 452-500;

26. Beck A, et al., Nat Rev Imm 2010; 10: 345–352

27. Huch M, et al., Nature 2013; 494 (7436): 247-250

28. Mahé MM, et al., Curr Protoc Mouse Biol 2013; 3: 217-240

29. Shimkets RA, Gene Expression Profiling. Meth. in Mol. Biology; 258. Humana Press

30. Raghavachari N, et al., Gene Expression Analaysis, Meth. in Mol. Biol; 1783. Humana Press

31. Kurien BT, et al., Western Blotting, Methods in Molecullar Biology; 1312. Humana Press

32. Hnasko R, ELISA, Methods in Molecular Blology, 1318. Humana Press

33. Lipton MS, et al., Mass Spec. of Proteins and Peptides, Meth. in Mol. Biol., 492. Humana Press

34. Brady H, Apoptosis Meth. and Protocols, Meth. in Mol. Biol., 282 . Humana Press

35. Cheryl L et al., Protein-Protein interactions, Meth. in Mol. Biol., 1278. Humana Press

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с рецептором TMEM219 человека и ингибирует или снижает связывание IGFBP3 с указанным рецептором TMEM219.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, которое ингибирует, снижает или нейтрализует активацию рецептора TMEM219, индуцированную связыванием IGFBP3.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, которое не активирует путь TMEM219 при связывании с TMEM219 человека.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которое эффективно для сохранения бета-клеток у субъекта с диабетом и/или для профилактики разрушения островковых клеток, и/или для контроля уровней глюкозы в крови в модели in vivo.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, которое эффективно в уменьшении острого колита в модели in vivo.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, обладающее, по меньшей мере, одной активностью, выбранной из:

a. увеличение роста мини-кишки у здорового субъекта, леченного IGFBP3;

b. увеличение роста мини-кишки у пациента с IBD;

c. увеличение роста мини-кишки у здорового субъекта, леченного сывороткой диабетической энтеропатии;

d. увеличение экспрессии EphB2 и/или LGR5 в мини-кишке здорового субъекта, леченного IGFBP3;

e. снижение экспрессии каспазы 8 в мини-кишке здорового субъекта, леченного IGFBP3;

f. уменьшение потери β-клеток в β-клетках, обработанных IGFBP3;

g. увеличение экспрессии инсулина в β- клетках, обработанных IGFBP3;

h. ингибирование или уменьшение DSS-индуцированного апоптоза клеток кишечника;

i. восстановление экспрессии PCNA в обработанной DSS толстой кишке;

j. снижение апоптоза β-клеток в β-клетках, обработанных IGFBP3;

k. снижение оценки инсулита в модели диабета на животных;

l. уменьшение начала диабета в модели диабета на животных;

m. защита бета-клетки от повреждения в модели диабета на животных;

n. предотвращение потери бета-клеток в модели диабета на животных.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, отличающееся тем, что увеличение показателей a), b) и c) составляет, по меньшей мере, 20%; увеличение d) и e) составляет, по меньшей мере, 30%, предпочтительно, по меньшей мере, 50%; уменьшение f) и увеличение g), по меньшей мере, на 10%.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, содержащее:

a. вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4, 1, 8, 10, 56, 59, 62, 65 и 68;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 5, 2, 11, 57, 60, 63, 66 и 69; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 6, 3, 7, 9, 12, 13, 58, 61, 64, 67 и 70; и/или

b. вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:17, 14, 20, 23, 26, 29, 71, 77, 80, 82 и 85;

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:18, 15, 21, 24, 27, 30, 72, 78, 83 и 86; и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 19, 16, 22, 25, 28, 31, 73, 74, 75, 76, 79, 81, 84, 87, 166 и 167.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, содержащее:

- SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19 или Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact CDR TC01 или TC05 или

- SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 166 или Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact CDR TC03 или

- SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 167 или Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact CDR TC04 или

- SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87 или Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact CDR TM1.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, содержащее:

a. вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org);

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org); и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org); и/или

b. вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий:

i. последовательность CDR1 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org);

ii. последовательность CDR2 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org); и

iii. последовательность CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, определенной с использованием инструмента анализа abysis (www.abysis.org).

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, содержащее:

a. последовательность вариабельного домена тяжелой цепи аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: от SEQ ID NO:32 до SEQ ID NO:37 или от SEQ ID NO:88 до SEQ ID NO:95; или SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:169 и SEQ ID NO:170; или

b. последовательность вариабельного домена легкой цепи аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: от SEQ ID NO: 38 до SEQ ID NO: 43; или SEQ ID NO: 96 до SEQ ID NO: 103 или SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172 или SEQ ID NO: 173;

c. вариабельный домен тяжелой цепи (a) и вариабельный домен легкой цепи (b).

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, содержащее области VH и VL вместе, выбранные из группы, состоящей из: TC01, TC03, TC04, TC05, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, предпочтительно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее области VH и VL антитела TC01, TC03, TC04, TC05 или TM1.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 10, отличающееся тем, что указанное антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 VH, выбранные из таблицы 3.3, и CDR1, CDR2 и CDR3 VL, выбранные из таблицы 3.4.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пп., имеющее константу аффинности ниже или равную 10^{-7} M для TMEM человека.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое:

(a) специфически связывается с эпитопом на TMEM, где указанный эпитоп представляет собой тот же или аналогичный эпитоп, что и эпитоп, распознаваемый моноклональным антителом TC01, TC03, TC04, TC05, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4; или

(b) перекрестно конкурирует за связывание с моноклональным антителом TC01, TC03, TC04, TC05, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4; или

(c) демонстрирует такую же или подобную аффинность связывания или специфичность, или и то, и другое, как любой из TC01, TC03, TC04, TC04, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02.1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4; или же

(d) имеет одно или несколько биологических свойств молекулы антитела, описанного в настоящем документе, например, молекулы антитела, выбранного, например, из любого из TC01, TC03, TC04, TC04, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02. 1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4; или

(e) имеет одно или несколько фармакокинетических свойств молекулы антитела, описанного в настоящем документе, например, молекулы антитела, выбранного, например, из любого из TC01, TC03, TC04, TC04, TA02, TC02, TD01, TE01, TG02, TM1, TE02. 1, TE02.2, TE02.3, TE03, TE04, TE07, TE10, как определено в таблицах 2-19 и таблицах 3.1-3.4.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пп., представляющее собой человеческое или гуманизированное антитело.

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пп., представляющее собой антитело IgG2 или IgG4, предпочтительно, антитело IgG2 каппа, антитело IgG2 лямбда, антитело IgG4 каппа или антитело IgG4 лямбда, предпочтительно, указанные IgG2 или IgG4 являются IgG2 человека или IgG4 человека.

18. Выделенный полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пп., предпочтительно, указанный полинуклеотид представляет собой кДНК.

19. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 18, предпочтительно, указанный вектор выбран из группы, состоящей из плазмиды, вирусного вектора,

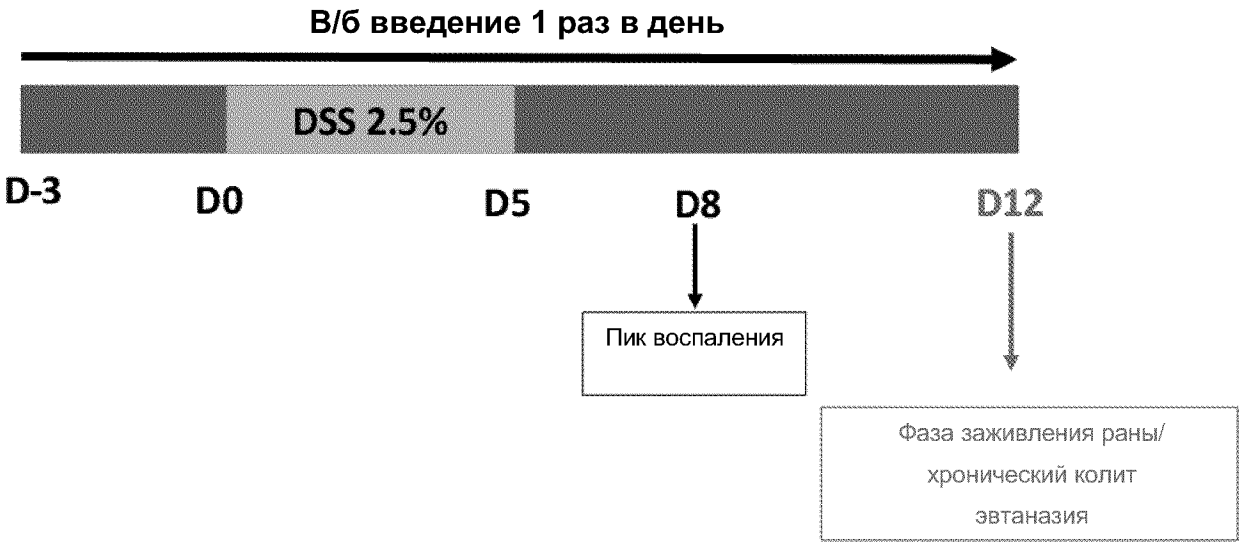
не эписомального вектора млекопитающих, вектора экспрессии и рекомбинантного вектора экспрессии.

20. Выделенная клетка, содержащая полинуклеотид по п. 18 или вектор по п. 19, предпочтительно, указанная выделенная клетка представляет собой гибридому, или клетку яичника китайского хомячка (CHO), или эмбриональную клетку почки человека (HEK293).

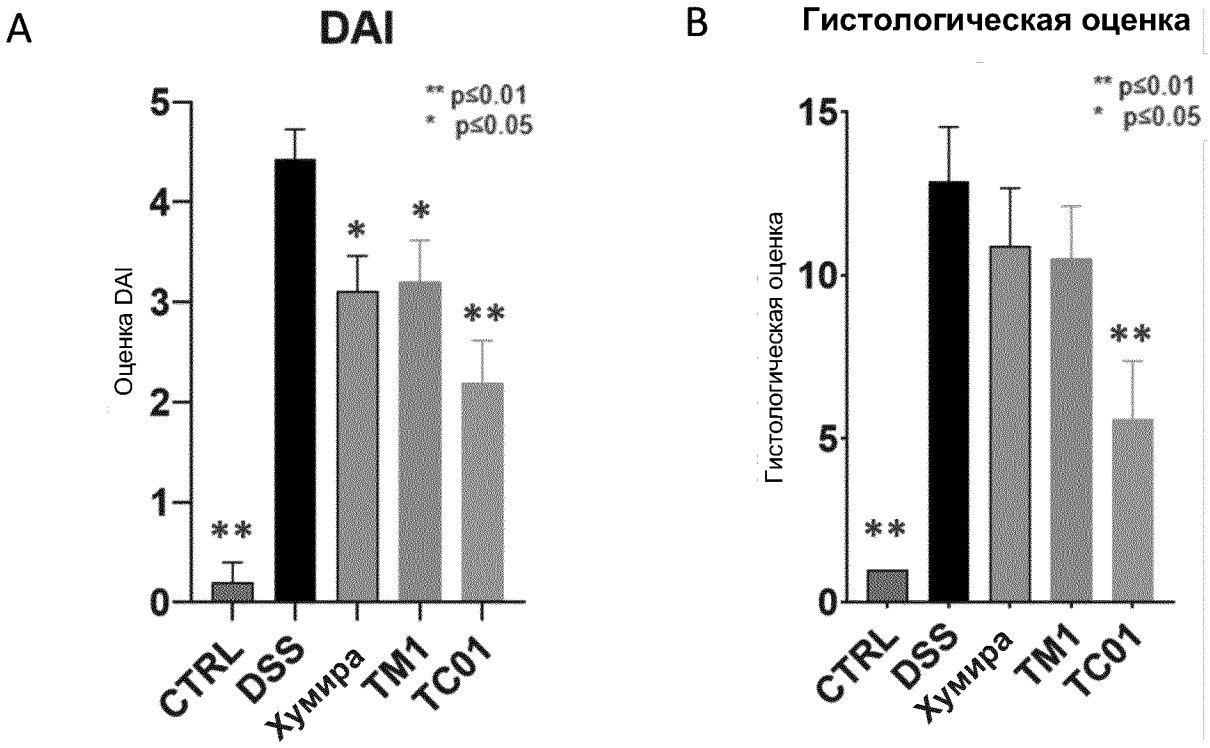
21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-17, или полинуклеотид по п. 18, или вектор по п. 19, или клетка по п. 20 для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для применения при лечении: диабета, нарушения кишечника и/или пищеварительного тракта, синдрома мальабсорбции, кахексии или диабетической энтеропатии, предпочтительно, диабета I типа или II типа, предпочтительно, нарушение кишечника и/или пищеварительного тракта представляет собой воспалительное заболевание кишечника, целиакию, язвенный колит, болезнь Крона или кишечную непроходимость.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-17, или полинуклеотид по п. 18, или вектор по п. 19, или клетку по п. 20, и фармацевтически приемлемый носитель, предпочтительно для применения при лечении: диабета, нарушения кишечника и/или пищеварительного тракта, синдрома мальабсорбции, кахексии или диабетической энтеропатии, предпочтительно, нарушение кишечника и/или пищеварительного тракта представляет собой воспалительное заболевание кишечника, целиакию, язвенный колит, болезнь Крона или кишечную непроходимость.

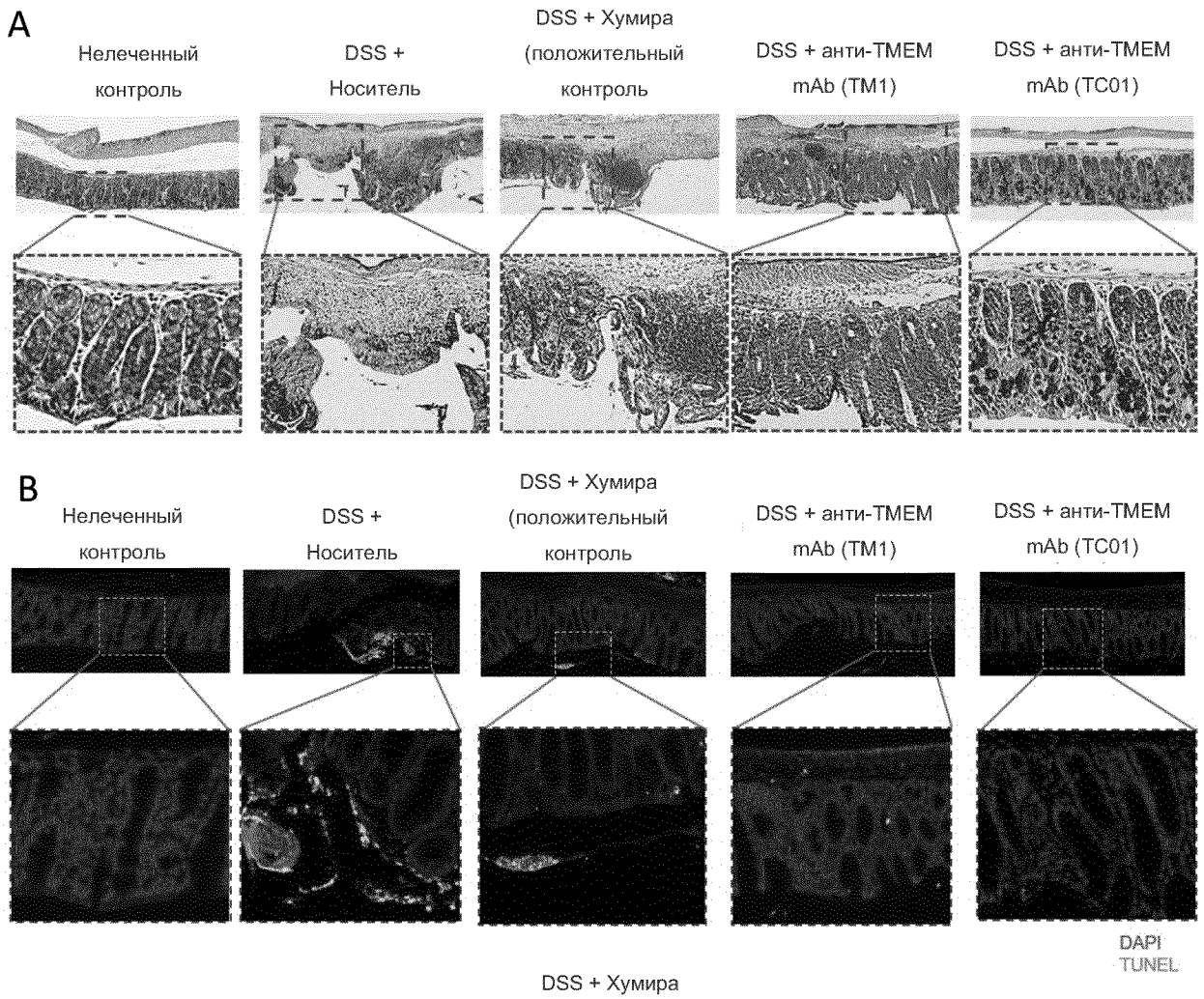
23. Способ ингибирования связывания IGFBP3 с рецептором TMEM219, включающий контакт TMEM219 с антителом по любому из пп. 1-17 или с композицией по п. 22.


В/б введение 1 раз в день
DSS 2.5%
D-3
D0
D5
D8
D12
Пик воспаления
Фаза заживления раны/
хронический колит
эвтаназия

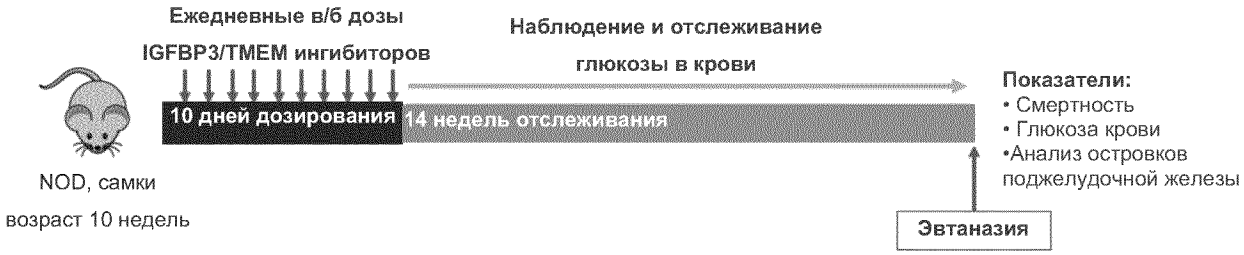
Фиг. 1


A
DAI
** p≤0.01
* p≤0.05
Оценка DAI
0
1
2
3
4
5
CTRL
DSS
Хумира
TM1
TC01
B
Гистологическая оценка
** p≤0.01
* p≤0.05
Гистологическая оценка
0
5
10
15
CTRL
DSS
Хумира
TM1
TC01

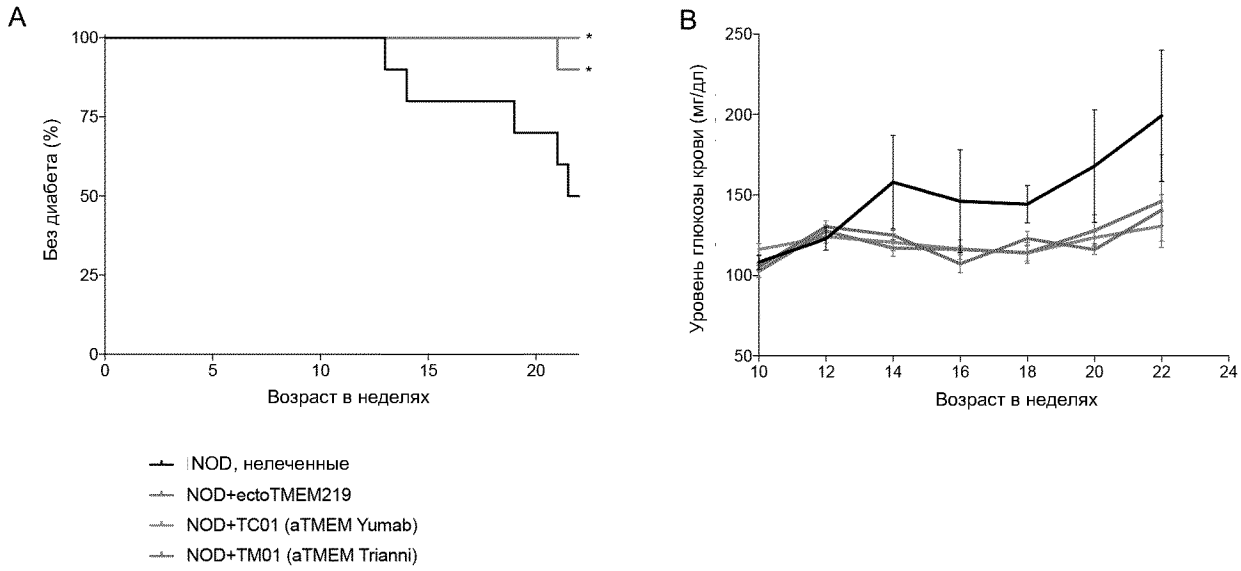
Фиг. 2


A
Нелеченный контроль
DSS + Носитель
DSS + Хумира (положительный контроль
DSS + анти-TMEM mAb (TM1)
DSS + анти-TMEM mAb (TC01)
B
Нелеченный контроль
DSS + Носитель
DSS + Хумира (положительный контроль
DSS + анти-TMEM mAb (TM1)
DSS + анти-TMEM mAb (TC01)
DAPI
TUNEL
C
Нелеченный контроль
DSS + Носитель
DSS + Хумира (положительный контроль
DSS + анти-TMEM mAb (TM1)
DSS + анти-TMEM mAb (TC01)
DAPI
PCNA

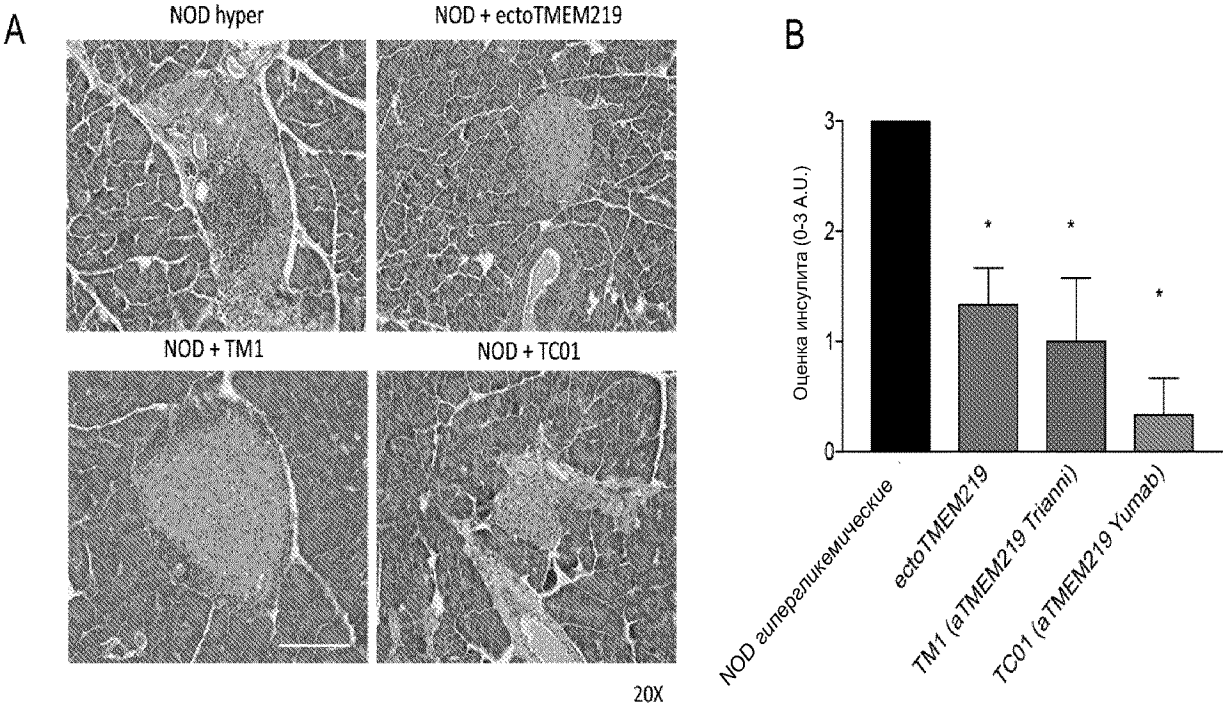
Фиг. 3


Ежедневные в/б дозы
IGFBP3/TMEM ингибиторов
Наблюдение и отслеживание
глюкозы в крови
10 дней дозирования
14 недель отслеживания
Показатели:
• Смертность
• Глюкоза крови
•Анализ островков
поджелудочной железы
NOD, самки
возраст 10 недель
Эвтаназия

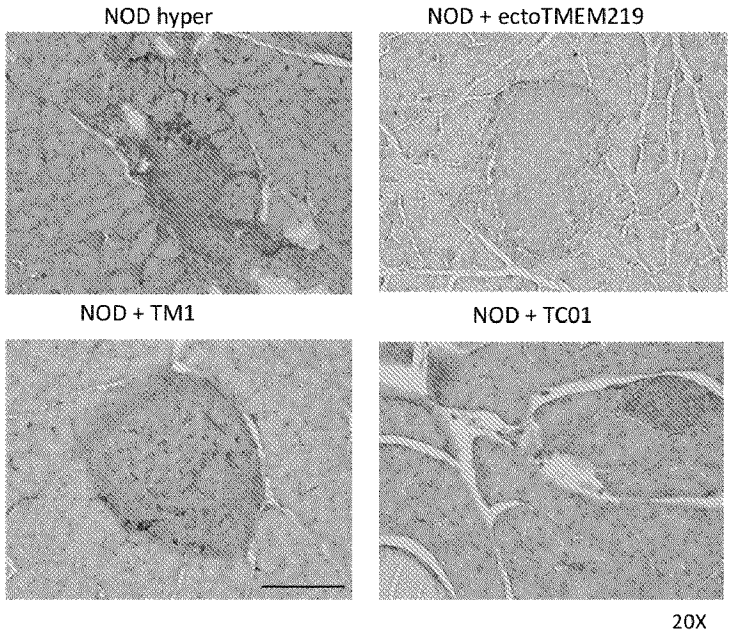
Фиг. 4


A
B
Без диабета (%)
Возраст в неделях
Уровень глюкозы крови (мг/дл)
Возраст в неделях
NOD, нелеченные
NOD+ectoTMEM219
NOD+TC01 (aTMEM Yumab)
NOD+TM01 (aTMEM Trianni)

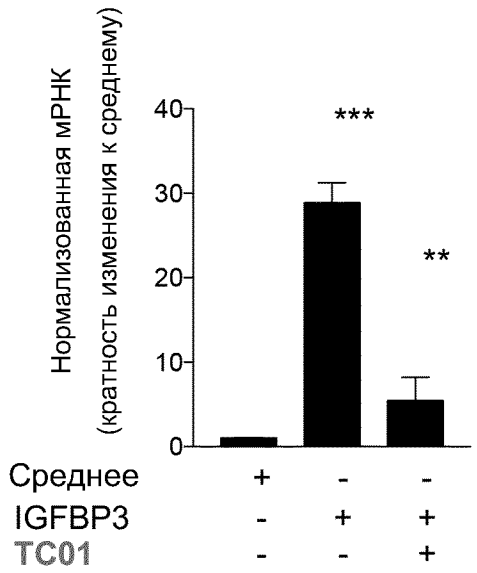
Фиг. 5


A
NOD hyper
NOD + ectoTMEM219
NOD + TM1
NOD + TC01
20X
B
Оценка инсулита (0-3 A.U.)
3
2
1
0
*
*
*
NOD гипергликемические
ectoTMEM219
TM1 (aTMEM219 Trianni)
TC01 (aTMEM219 Yumab)

Фиг. 6

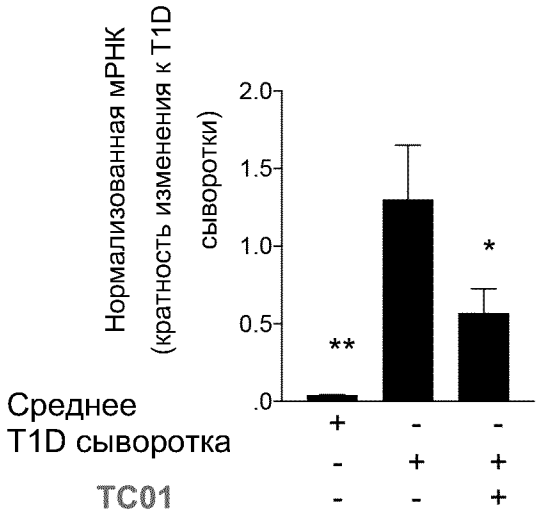

NOD hyper
NOD + ectoTMEM219
NOD + TM1
NOD + TC01
20X

Фиг. 7



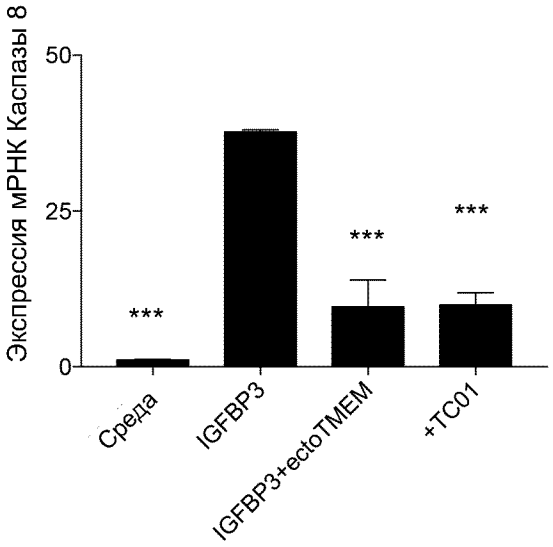
** p<0,01 к IGFBP3 *** p<0,001 к IGFBP3 (n=3 эксперимента)

Фиг. 8



* p<0,05 к T1D ** p<0,01 к T1D (n=3 эксперимента)

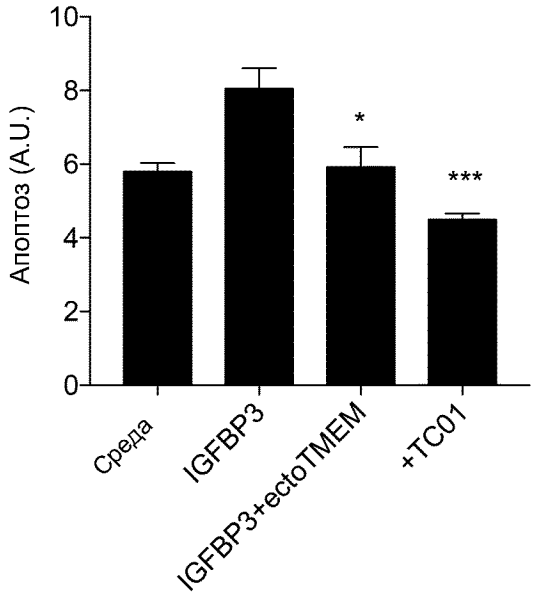
Фиг. 9



N=3 эксперимента

***P < 0,001 к IGFBP3

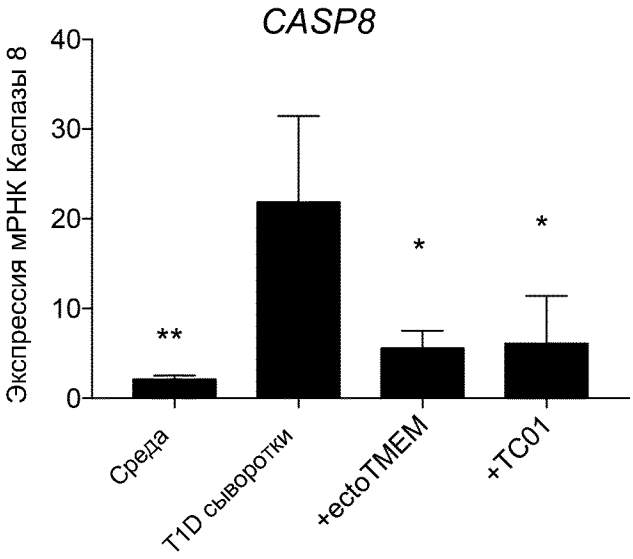
Фиг. 10



N=3 эксперимента

***P < 0,001 к IGFBP3; *p < 0,05

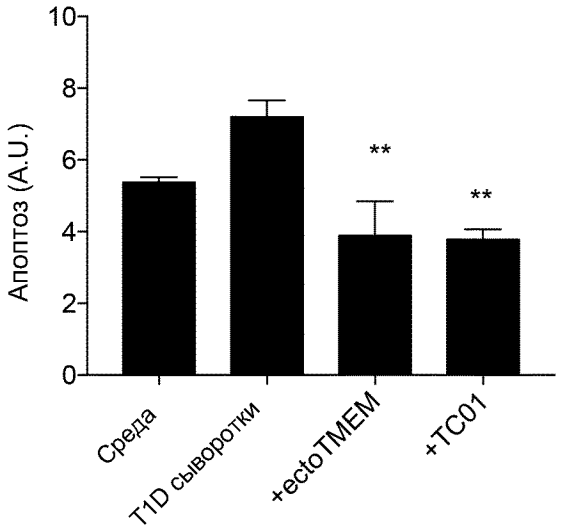
Фиг. 11



N=3 эксперимента

**P < 0,01 к T1D сыворотки; *p < 0,05 к T1D сыворотки

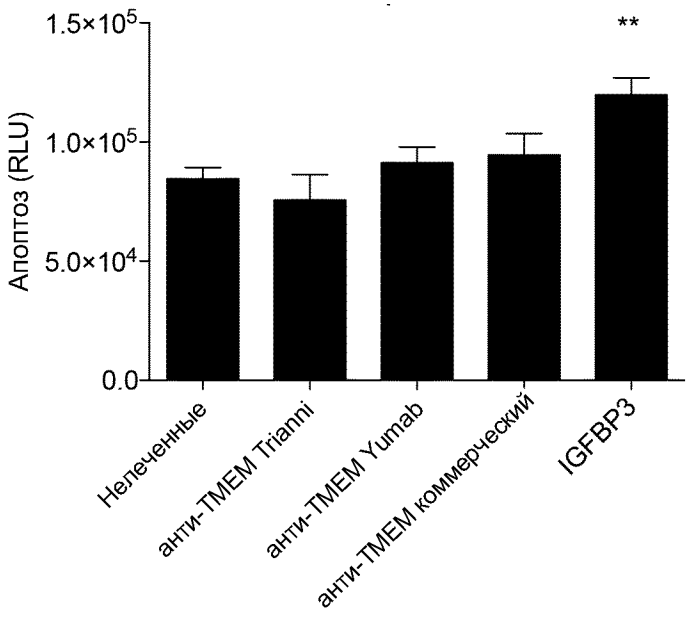
Фиг. 12



N=3 эксперимента

**P < 0,001 к T1D сыворотки

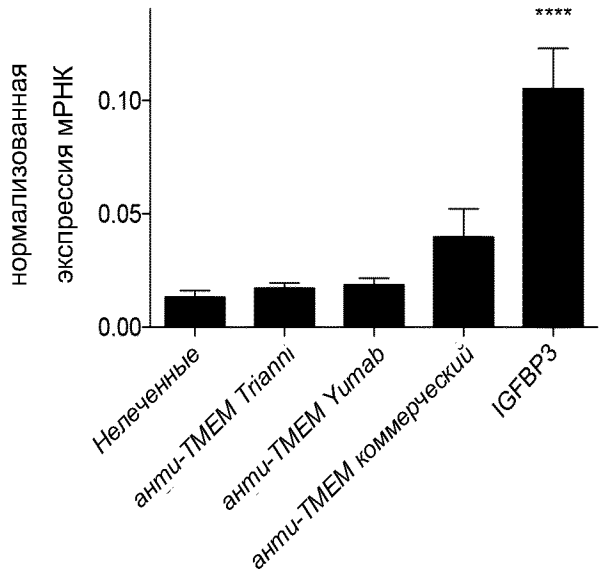
Фиг. 13



** p<0,01 IGFBP3 к нелеченным

Эксперименты проводят трижды в Beta-lox5, культивируемых в течение 72 ч

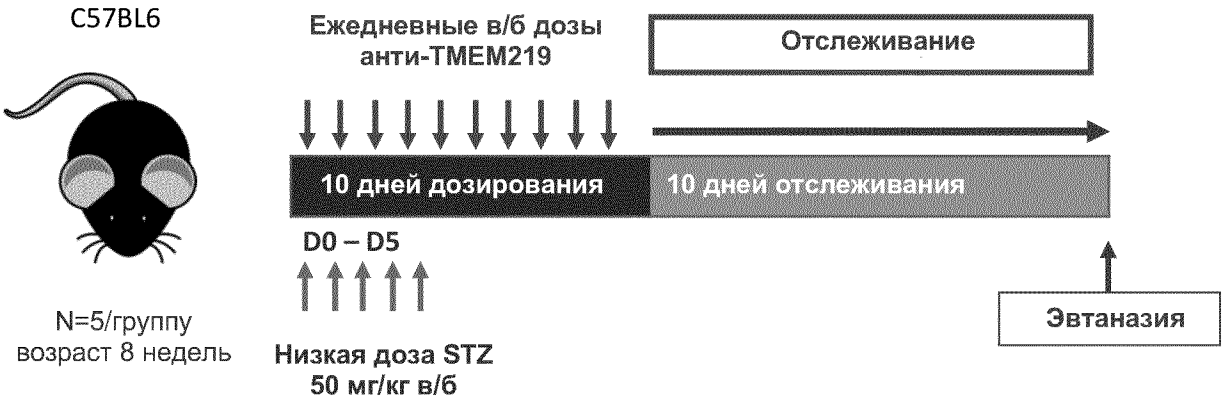
Фиг. 14



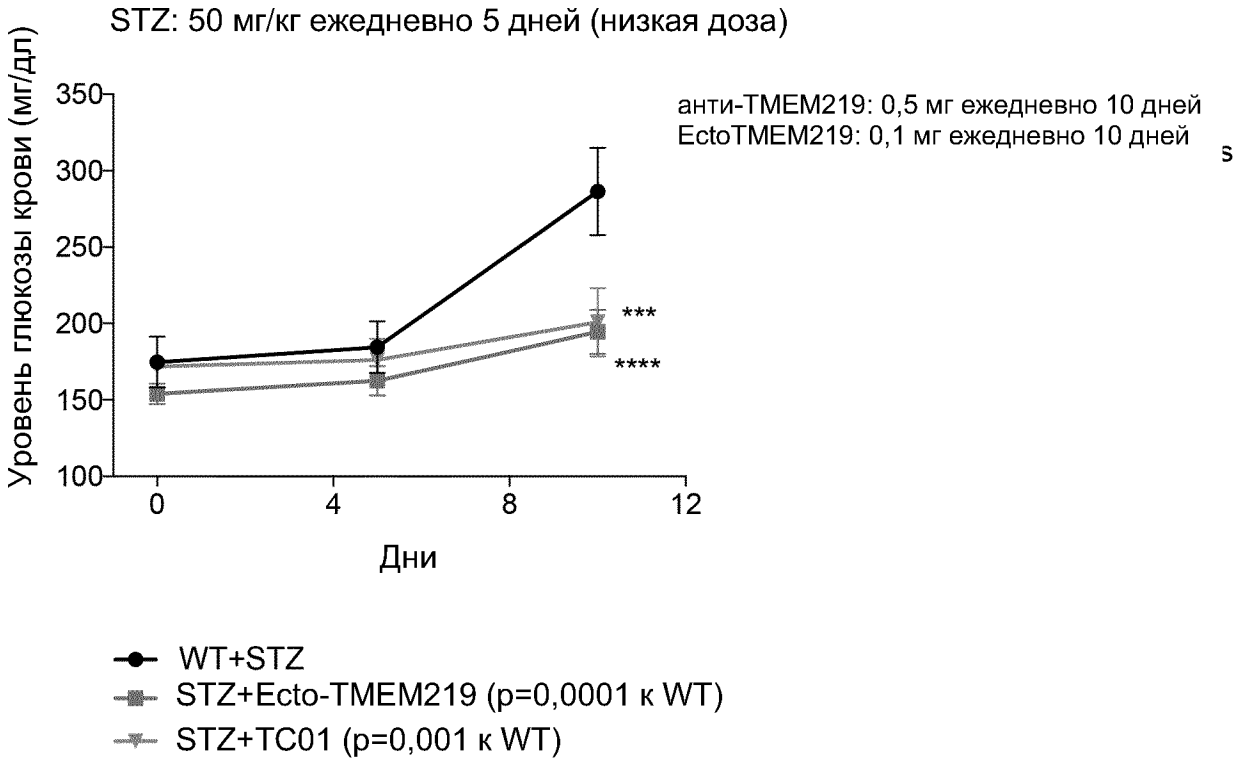
**** p<0,0001 IGFBP3 к нелеченным, анти-TMEM219 Trianni, анти-TMEM219 Yumab; **p<0,01 IGFBP3 к анти-TMEM219 коммерческому

Эксперименты проводят трижды в Beta-lox5, культивируемых в течение 72 ч

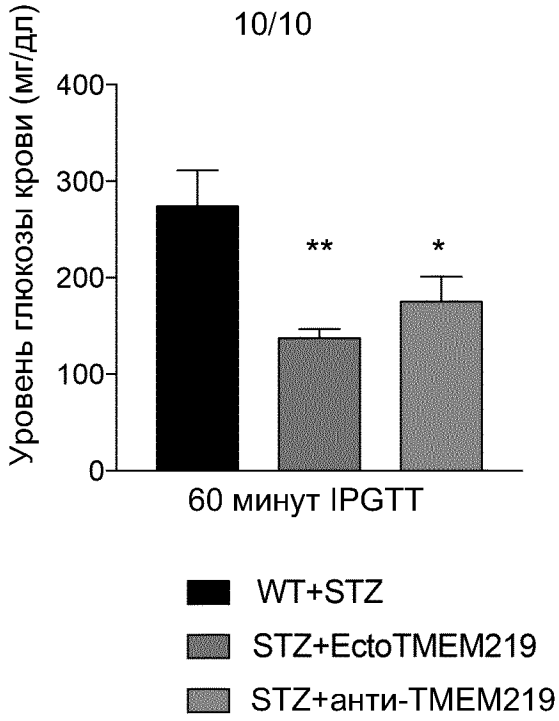
Фиг. 15


C57BL6
Ежедневные в/б дозы
анти-TMEM219
Отслеживание
10 дней дозирования
10 дней отслеживания
D0 – D5
Эвтаназия
N=5/группу
возраст 8 недель
Низкая доза STZ
50 мг/кг в/б

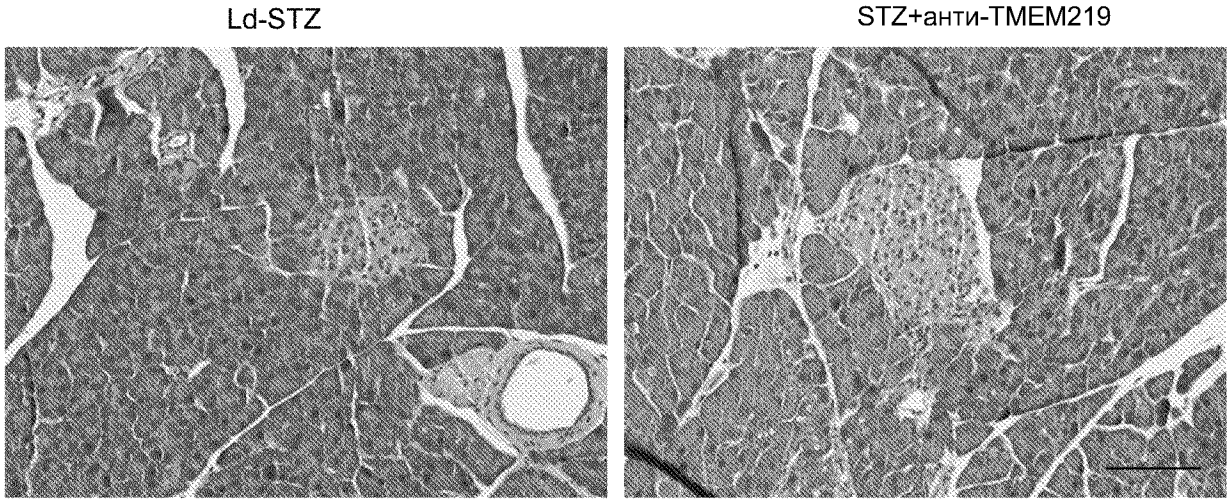
Фиг. 16


STZ: 50 мг/кг ежедневно 5 дней (низкая доза)
анти-TMEM219: 0,5 мг ежедневно 10 дней
EctoTMEM219: 0,1 мг ежедневно 10 дней
Уровень глюкозы крови (мг/дл)
350
300
250
200
150
100
0
4
8
12
Дни
***
****
WT+STZ
STZ+Ecto-TMEM219 (p=0,0001 к WT)
STZ+TC01 (p=0,001 к WT)

Фиг. 17


10/10
Уровень глюкозы крови (мг/дл)
400
300
200
100
0
**
*
60 минут IPGTT
WT+STZ
STZ+EctoTMEM219
STZ+анти-TMEM219

Фиг. 18


Ld-STZ
STZ+анти-TMEM219

Фиг. 19