

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390812 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.06

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.09.14

(54) АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С IL-1RAP, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 20195961.6; 21151218.1; 21159485.8;
21179711.3

(72) Изобретатель:

Макуан Жули, Крозе Амели, Луйо
Жереми, Монни Тьерри, Мбоу Ламин,
Дуси Мари-Агнес, Лабанка Валентина
(CH)

(32) 2020.09.14; 2021.01.12; 2021.02.26;
2021.06.16

(33) EP

(86) PCT/EP2021/075235

(74) Представитель:

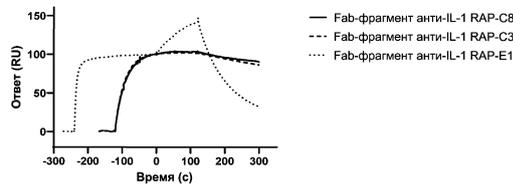
Нилова М.И. (RU)

(87) WO 2022/053715 2022.03.17

(71) Заявитель:

ИХНОС САЙЕНСИЗ СА (CH)

(57) Изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с IL-1RAP человека и могут также связываться с IL-1RAP яванского макака и/или мыши. Настоящее изобретение также относится к применению таких антител для диагностики и лечения заболевания у человека.



A1

202390812

202390812

A1

АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С IL1RAP, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антителам и производным, которые специфически связываются с человеческим IL1RAP. Настоящее изобретение также относится к применению таких антител для диагностики и лечения заболевания у человека.

5 ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вспомогательный белок рецептора интерлейкина-1 (IL1RAP или IL1-Rap) представляет собой компонент комплекса рецептора интерлейкина-1, который инициирует события передачи сигнала, которые приводят к активации генов, отвечающих на воздействие интерлейкина-1. Альтернативный сплайсинг продуктов этого гена приводит к образованию мембраносвязанных и растворимых изоформ, различающихся своими
10 С-концами. Отношение растворимых форм к мембраносвязанным формам возрастает во время индукции острой фазы или стресса.

Цитокиновые лиганды семейства интерлейкина-1 (IL-1) и рецепторы IL-1 ассоциированы с воспалением, аутоиммунными реакциями, регуляцией иммунной системы, пролиферацией клеток и защитой организма-хозяина и вносят вклад в патологическое развитие воспалительных, аутоиммунных, связанных
15 с регуляцией иммунной системы, дегенеративных и связанных с пролиферацией клеток (например, онкологических) заболеваний и нарушений, при этом цитокины семейства IL-1 и рецепторы IL-1 служат в качестве патогенных медиаторов таких заболеваний и состояний. См., например, Garlanda et al., *Immunity*, 39:1003-1018 (2013).

Семейство цитокинов IL-1 включает интерлейкин-1 альфа, интерлейкин-1 бета, интерлейкин-33, интерлейкин-36 альфа, интерлейкин-36 бета и интерлейкин-36 гамма. Каждый из этих цитокинов служит
20 в качестве лиганда, способного связываться со специфическим рецептором клеточной мембраны для семейства IL-1, экспрессируемым на поверхности определенных клеток. При связывании цитокина семейства IL-1 с его когнатным рецептором происходит присоединение корецептора с образованием тройного комплекса, содержащего цитокин, его соответствующий мембранный рецептор и его
25 корецептор. Полученный комплекс способствует внутриклеточной передаче сигнала и активации ряда факторов транскрипции, включая NF-κB и AP-1, и митоген-активируемых протеинкиназ, что запускает каскад воспалительных и иммунных ответов, в том числе выработку множества цитокинов, хемокинов, ферментов и молекул адгезии.

IL1RAP служит в качестве общего корецептора клеточной мембраны для нескольких рецепторов цитокинов семейства IL-1, включая рецептор 1 интерлейкина-1, ST2, также известный как белок 1, подобный рецептору интерлейкина-1, и белок 2, подобный рецептору интерлейкина-1 (IL1RL2). IL1RAP является обязательным компонентом тройного сигнального комплекса, образованного одним из
30 цитокинов семейства IL-1, указанных выше, специфическим когнатным рецептором цитокина и корецептором IL1RAP. Таким образом, IL1RAP выполняет важную функцию в путях передачи сигнала цитокинов семейства IL-1, так как он необходим для облегчения стимуляции определенных нижележащих сигнальных путей, осуществляемой цитокинами семейства IL-1 — IL-1α, IL-1β, IL-33, IL-36α, IL-36β и IL-

36у.

WO2012098407A1 относится к агентам, содержащим связывающий фрагмент, такой как антитела, обладающий специфичностью в отношении IL1RAP, для применения в индукции гибели клеток и/или ингибировании роста и/или пролиферации клеток, ассоциированных с солидными опухолями, которые экспрессируют IL1RAP. В WO2012098407A1 описано моноклональное мышиное антитело IgG2a к 5 человеческому IL1RAP, mAb 81.2, которое при введении *in vivo* приводило к статистически значимой задержке роста опухоли в мышинной модели меланомы.

WO2015132602A1 относится к антителам, обладающим специфичностью в отношении человеческого IL1RAP, и их применению для лечения солидных опухолей. В WO2015132602A1 описано специфическое 10 антитело мышиноного происхождения CAN04, которое специфически связывается с доменом 2 человеческого IL1RAP с KD 200 пМ, перекрестно реагирует с IL1RAP яванского макака, способно индуцировать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) в одной или более линиях раковых клеток (таких как CML) и обладает некоторым ингибирующим действием в отношении передачи сигнала, стимулируемой IL-1 α , IL-1 β и IL-33.

В WO2016020502A1 описаны два специфических антитела мышиноного происхождения CAN01 и CAN03, 15 которые специфически связываются с доменом 3 человеческого IL1RAP с KD 1,4 и 0,9 нМ соответственно, перекрестно реагируют с IL1RAP яванского макака и способны индуцировать ADCC в одной или более линиях раковых клеток (таких как CML). Было определено, что CAN03 обладает некоторым ингибирующим действием в отношении передачи сигнала, стимулируемой IL-1 α , IL-1 β и IL-33, тогда как CAN01 не обладает заметным ингибиторным действием в отношении передачи сигнала от 20 IL-1 α , IL-1 β и IL-33.

WO2016207304A1 относится к антителам кроличьего происхождения, которые специфически связываются с человеческим IL-1RAP, обладают некоторым ингибирующим действием в отношении активности NF κ B, стимулируемой IL-1 α , IL-1 β , IL-33 и/или IL-36 β .

WO2017191325A9 относится к гуманизированным антителам IgG1, которые специфически связываются с человеческим IL-1R3 и обладают некоторым ингибирующим действием в отношении активности NF κ B, стимулируемой IL-1 α , IL-1 β , IL-33 и/или IL-36 β .

WO2020037154A1 относится к гуманизированным антителам, которые специфически связываются с человеческим IL-1RAP и обладают некоторым ингибирующим действием в ограниченных моделях *in vitro*.

30 Сохраняется потребность в терапевтических средствах для лечения, облегчения симптомов или предотвращения воспалительных, аутоиммунных, связанных с регуляцией иммунной системы, дегенеративных и связанных с пролиферацией клеток заболеваний и нарушений, ассоциированных с нарушением передачи сигналов через цитокиновые лиганды семейства IL-1 и рецепторы.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее описание относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим IL1RAP с высокой аффинностью. Антитела способны снижать, ингибировать и/или полностью блокировать сигнальные пути IL-1, IL-33 и/или IL-36, включая передачу сигналов, стимулируемую связыванием одного или более из следующих агонистов: IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ . Настоящее описание также относится к способам лечения заболеваний и состояний, отвечающих на ингибирование передачи сигналов от IL-1, IL-33 и/или IL-36.

У аутоиммунных заболеваний часто имеется множество причин, и они могут развиваться из-за неправильного взаимодействия нескольких сигнальных путей. Таким образом, настоящее изобретение относится к антителам к IL1RAP, которые ингибируют все три сигнальных пути IL-1, IL-33 и/или IL-36.

10 Антитела по заявленному изобретению вызывают блокирование всех трех цитокиновых сигнальных путей, опосредуемых IL1RAP, например, на фибробластах и мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC).

При блокировке всех трех сигнальных путей подавляется действие множества факторов развития заболевания, ассоциированных с провоспалительными цитокинами семейства IL-1, включая IL1R, IL33R и IL36R, что отличает ISB 880 от терапевтических средств, блокирующих один цитокин, или более ранних антител к IL1RAP, которые не являются антагонистами всех трех сигнальных путей.

В некоторых вариантах осуществления настоящее описание относится к антителу к IL1RAP, содержащему первую определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой цепи (CDR-H1), вторую область CDR тяжелой цепи (CDR-H2) и третью область CDR тяжелой цепи (CDR-H3), выбранные из группы:

(a) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность GFXXXXXXXXX (SEQ ID NO: 265), где X в положении 3 может являться любой из аминокислот I, T, P; X в положении 4 может являться любой из аминокислот L, F, Y; X в положении 5 может являться любой из аминокислот A, S, P, E, D; X в положении 6 может являться любой из аминокислот V, G, T, H, Q, E, N, D; X в положении 7 может являться любой из аминокислот F, A, S, Y; X в положении 8 может являться любой из аминокислот A, G, S, P; X в положении 9 может являться любой из аминокислот E, M, A; X в положении 10 может являться любой из аминокислот G, T, S, N;

(b) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность AISYDGGEGTL (SEQ ID NO: 266);

(c) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность ARFXYYXAFDY (SEQ ID NO: 267), где X в положении 4 может являться любой из аминокислот R, H; X в положении 6 может являться любой из аминокислот Y, R; X в положении 7 может являться любой из аминокислот T, S;

или

(d) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность GXXXXXXAIX (SEQ ID NO: 262), где X в положении 2 может являться любой из аминокислот V, G, S, P, E; X в положении 3 может являться любой

из I, E, A, G, T, S, P, H, K, R; X в положении 4 может являться любой из E, F, A, S, W, H, N, R; X в положении 5 может являться любой из G, T, S, Y, P, H, E, N, R; X в положении 6 может являться любой из аминокислот V, A, S, P, Q, N, D; X в положении 7 может являться любой из аминокислот Y, H; X в положении 10 может являться любой из аминокислот H, Q;

5 (e) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность YIPXXGXXD (SEQ ID NO: 263), где X в положении 5 может являться любой из аминокислот T, S; X в положении 6 может являться любой из аминокислот V, L; X в положении 8 может являться любой из аминокислот G, Q; X в положении 9 может являться любой из аминокислот F, Y;

(f) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность ARGQTEYXXGRQFDI (SEQ ID NO: 264), где
10 X в положении 8 может являться любой из аминокислот A, E, D; X в положении 9 может являться любой из аминокислот A, T, S; и

причем указанное антитело к IL1RAP содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 268.

В некоторых вариантах осуществления настоящее описание относится к антителу к IL1RAP,
15 содержащему (i) первую область CDR тяжелой цепи (CDR-H1), вторую область CDR тяжелой цепи (CDR-L2) и третью область CDR тяжелой цепи (CDR-L3), причем: (a) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 81–140; (b) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 141–200; (c) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 201–260.

20 В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания содержит аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH), по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 8–51, 60–70.

Настоящее изобретение относится к антителу к IL1RAP, содержащему области CDR тяжелой цепи с SEQ ID NO: 128, 188 и 248.

25 В различных вариантах осуществления антитела к IL1RAP настоящего описания антитело характеризуется одним или более из следующих свойств:

(a) антитело связывается с человеческим IL1RAP с аффинностью связывания 1×10^{-8} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 1×10^{-10} М или менее либо 1×10^{-11} М или менее; причем необязательно аффинность связывания измеряется по равновесной константе диссоциации (KD) при взаимодействии с полипептидом
30 IL1RAP с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 6;

(b) антитело ослабляет стимулированный IL-1 сигнал, стимулированный IL-33 сигнал и/или стимулированный IL-36 сигнал на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100%; причем необязательно ослабление сигнала измеряют с применением клеточного анализа блокировки; причем необязательно стимулированные IL-1, IL-33 и/или IL-36 сигналы стимулированы

агонистом, выбранным из IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ ;

(c) антитело ослабляет внутриклеточный сигнал, инициированный связыванием одного или более из агонистов IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ с его когнатным рецептором, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100%; причем необязательно ослабление
5 внутриклеточного сигнала измеряют с применением клеточного анализа блокировки;

(d) антитело ингибирует стимулированное IL-1 α , IL-1 β и/или IL-36 β высвобождение IL8 из клеток первичной клеточной линии кератиноцитов HaCaT;

(e) антитело ингибирует стимулированное IL-1 β высвобождение IL8 из первичных мононуклеарных клеток человека;

10 (f) антитело ингибирует стимулированное IL-33 высвобождение INF- γ из первичных мононуклеарных клеток человека;

(g) антитело ингибирует активацию нейтрофилов при инкубации с кондиционированной HaCaT средой после стимуляции IL-1 β и IL-36 γ ;

(h) антитело связывается с аминокислотными остатками в домене 2 человеческого IL1RAP;

15 (i) антитело перекрестно реагирует с полипептидом IL1RAP яванского макака с последовательностью SEQ ID NO: 7; и/или

(j) антитело перекрестно реагирует с полипептидом мышинного IL1RAP с последовательностью SEQ ID NO: 261.

Настоящее описание также относится к вариантам осуществления антитела к IL1RAP, причем: (i)
20 антитело является моноклональным антителом; (ii) антитело является человеческим, гуманизированным или химерным антителом; (iii) антитело является полноразмерным антителом класса IgG, причем необязательно антитело класса IgG имеет изотип, выбранный из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4; (iv) антитело является вариантом области Fc, необязательно вариантом области Fc, который изменяет эффекторную функцию (например, вариантом, вызывающим усиление или ослабление эффекторной функции),
25 вариантом области Fc, который демонстрирует пониженную активность комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), активность ADCC и/или активность антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), вариантом области Fc, который демонстрирует пониженную цитотоксическую активность в отношении человеческих моноцитов, нейтрофилов и/или клеток Jurkat, или вариантом области Fc, который изменяет период полувыведения антитела; (v) антитело является фрагментом антитела,
30 необязательно выбранным из группы, состоящей из F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, однодоменного антитела (VHH) и scFv; (vi) антитело является иммуноконъюгатом, причем необязательно иммуноконъюгат содержит терапевтический агент для лечения IL1RAP-опосредованного заболевания или состояния; (vii) антитело является мультиспецифическим антителом, необязательно биспецифическим антителом; и (viii) антитело является синтетическим антителом, в котором области CDR пересажены в каркас, отличный от каркаса

иммуноглобулинов; необязательно каркас, выбранный из каркаса другого белка и каркаса из искусственного полимера.

В других вариантах осуществления настоящее описание относится к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим антитела к IL1RAP, описанные в настоящем документе.

- 5 В некоторых вариантах осуществления настоящее описание также относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к IL1RAP, описанное в настоящем документе.

Описание также относится к способу получения антитела к IL1RAP, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту (или вектор), кодирующую антитело к IL1RAP, с образованием таким образом антитела.

- 10 В некоторых вариантах осуществления описание относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело к IL1RAP, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит терапевтический агент для лечения опосредованного IL-1, IL-33, IL-36 и/или IL1RAP заболевания или состояния; причем необязательно терапевтический агент является
- 15 химиотерапевтическим препаратом.

Настоящее описание также относится к способу лечения IL1RAP-опосредованного заболевания у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к IL1RAP, описанного в настоящем документе, или терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции антитела к IL1RAP, описанного в настоящем документе.

- 20 Настоящее описание также относится к способу лечения заболевания, опосредованного передачей сигнала от IL-1, IL-33 и/или IL-36, у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к IL1RAP, описанного в настоящем документе, или терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции антитела к IL1RAP, описанного в настоящем документе.

- 25 Настоящее описание также относится к способу лечения заболевания, опосредованного передачей сигнала, стимулируемой IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ , у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к IL1RAP, описанного в настоящем документе, или терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции антитела к IL1RAP, описанного в настоящем документе.

- 30 В различных вариантах осуществления способов лечения, описанных в настоящем документе, IL1RAP-опосредованные заболевания и состояния или заболевания, опосредованные передачей сигнала от IL-1, IL-33 и/или IL-36, включают воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, аутовоспалительные заболевания, респираторные заболевания, нарушения обмена веществ, инфекции и онкологические заболевания. В некоторых вариантах осуществления IL1RAP-опосредованные
- 35 заболевания и состояния могут быть выбраны из акне, панкреатита, возрастной макулярной дегенерации

(AMD), гиперчувствительности дыхательных путей, воспаления дыхательных путей, аллергического конъюнктивита, бокового амиотрофического склероза (БАС), аллергического ринита, аллергии, болезни Альцгеймера / деменции, бокового амиотрофического склероза (БАС), нейтрофильных дерматозов, гнойного гидраденита, ихтиоза, анафилаксии, артрита, астмы / атопии / полипов носа, атеросклероза, атопического дерматита, аутоиммунных/аутовоспалительных васкулитов (включая, без ограничений, гигантоклеточный артериит, артериит Такаясу, болезнь Кавасаки), болезни Бехчета (включая поражение нервной системы при болезни Бехчета), рака костей, рака головного мозга, рака молочной железы, кахексии/анорексии, воспаления хряща, церебральной ишемии, синдрома хронической усталости, хронической обструктивной болезни легких, заболеваний, ассоциированных с клостридиями, колоректального рака, застойной сердечной недостаточности, конъюнктивита, воспаления коронарных артерий, рестеноза коронарных сосудов, сахарного диабета, диабетического макулярного отека, диабетической ретинопатии, заболевания сухого глаза, эндометриоза, эозинофильного заболевания желудочно-кишечного тракта, эозинофильного эзофагита, семейного холодового аутовоспалительного синдрома, семейной средиземноморской лихорадки, фибромиалгии, фиброзирующего заболевания, пищевой аллергии, генерализованного пустулезного псориаза, глаукомы, гломерулонефрита, подагрического артрита, реакции «трансплантат против хозяина», гельминтной инвазии, геморрагического шока, гнойного гидраденита, гипералгезии, синдрома гипериммуноглобулинемии D, гиперурикемии, идиопатического легочного фиброза (IPF), боли, вызванной онкологическим заболеванием, инфекции, воспалительного заболевания кишечника (IBD, включая, без ограничений, язвенный колит и болезнь Крона), воспалительных состояний, вызванных напряжением, воспалительного заболевания глаза, ассоциированного с трансплантацией роговицы, воспалительной боли, осложнений, связанных с гриппом, рака кишечника, ишемии, ювенильного артрита, болезни Кавасаки, рака почки, врожденного амавроза Лебера, рака печени, заболевания печени, рака легких, синдрома активации макрофагов (MAS), макулярной дегенерации, синдрома Макла — Уэллса, множественной миеломы, рассеянного склероза, скелетно-мышечной боли, миелогенной лейкемии и лейкемии других типов, миелодиспластических синдромов (MDS), нарушения функции миокарда, миопатий, полипа носа, мультисистемного воспалительного заболевания неонатального возраста, нейротоксичности, нейтрофильных заболеваний кожи (включая ладонно-подошвенный пустулез, гангренозную пиодермию, псориаз, синдром Свита), неинфекционного конъюнктивита, неинфекционного увеита, немелкоклеточного рака легких, ортопедического хирургического вмешательства, остеоартрита, остеопороза, боли, рака поджелудочной железы, болезни Паркинсона, заболевания пародонта, заболевания периферических сосудов, ревматической полимиалгии, полипозной хориоидальной васкулопатии (PCV), преэклампсии или эклампсии, преждевременных родов, рака предстательной железы, протозойной инфекции, псориаза, псориатического артрита, гангренозной пиодермии, системного склероза, реперфузионного повреждения, респираторно-синцитиального вируса (RSV), рестеноза, в частности, после ангиопластики и стентирования, отслойки сетчатки, пигментозного ретинита, ретинопатии недоношенных (ROP), ревматоидного артрита, септического шока, серповидно-клеточной анемии, побочных эффектов лучевой терапии, синдрома SAPHO (синовит, акне, пустулез, гиперостоз и остит), синусита, рака кожи, нарушения сна, воспаления, вызванного растяжением, болезни Стилла, рака желудка, системной красной волчанки (включая волчаночный нефрит), заболевания

височно-нижнечелюстного сустава, периодического синдрома, ассоциированного с мутацией гена рецептора TNF, и других генетически обусловленных лихорадочных синдромов, отторжения трансплантата, травмы, травматического повреждения глаза, сахарного диабета 2-го типа и витилиго.

5 В некоторых вариантах осуществления настоящее описание также относится к способу лечения онкологического заболевания у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к IL1RAP, описанного в настоящем документе, или терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции антитела к IL1RAP, описанного в настоящем документе. В вариантах осуществления онкологическое заболевание выбрано из рака молочной железы, колоректального рака, мелкоклеточного рака легких, рака поджелудочной железы.

10 В некоторых вариантах осуществления настоящее описание также относится к способу обнаружения уровня IL1RAP в биологической пробе, включающему стадию приведения пробы в контакт с антителом к IL1RAP, описанным в настоящем документе. Антитела к IL1RAP настоящего описания можно применять в любом известном методе анализа, таком как анализ конкурентного связывания, прямой и непрямой анализ типа «сэндвич», анализы иммунопреципитации и иммуноферментные анализы (ИФА)
 15 (см. Sola, 1987, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158, CRC Press, Inc.), для обнаружения и количественной оценки IL1RAP. Антитела связываются с человеческим полипептидом IL1RAP (SEQ ID NO: 1 или 6) с высокой аффинностью, пригодной для широкого спектра анализов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Блокировка образования комплекса человеческих IL-1RAP/IL-1R1/IL-1 β (корцептора/рецептора/цитокина) при связывании Fab-фрагмента анти-C8 к IL-1RAP и Fab-фрагмента анти-C3 к IL-1RAP с человеческим IL-1RAP, оцениваемая методом поверхностного плазмонного резонанса. Рекомбинантный человеческий слитный белок IL-1RAP, содержащий область Fc, иммобилизовали на сенсорном чипе серии S CM5, покрытом антителами к области Fc человеческого IgG. Вводили Fab-фрагмент в концентрации 300 нМ в буфере HBS-EP+ для достижения насыщения мест связывания с иммобилизованным человеческим IL-1RAP, затем обеспечивали второе введение предварительно смешанного раствора IL-1R1 в концентрации 50 нМ, IL-1 β в концентрации 100 нМ и Fab-фрагмента в концентрации 300 нМ в буфере HBS-EP+. В качестве не блокирующего контроля использовали Fab-фрагмент анти-E1 к IL-1RAP. Данные на графике представлены как зависимость количественного показателя в резонансных единицах (сокращенно: RU; ось Y) от времени (ось X).
 25
 30 Кривые обозначены названием клона Fab-фрагмента, использованного для насыщения мест связывания.

Фиг. 2. Картирование доменов клона C8 антитела к IL-1RAP и клона C3 антитела к IL-1RAP по связыванию с химерным белком IL-1RAP человек-курица с применением поверхностного плазмонного резонанса. Анти-C8 IgG1 LALA к IL-1RAP (A) или анти-C3 IgG1 LALA к IL-1RAP (B) иммобилизовали на сенсорном чипе серии S CM5, покрытом антителами к области Fc человеческого IgG. Химерные белки IL-1RAP человек-курица вводили в раствор над иммобилизованными антителами IgG1 LALA к IL-1RAP в концентрации 50 нМ в буфере HBS-EP+ и затем проводили диссоциацию в буфере HBS-EP+; буквами hs обозначен человеческий домен и буквами gg обозначен куриный домен. Далее химерные белки

человек-курица описывали в соответствии с порядком следования человеческих и куриных доменов, например hs-gg-gg IL-1RAP обозначает белок IL-1RAP с человеческим доменом 1, куриным доменом 2 и куриным доменом 3. Данные на графиках представлены как зависимость количественного показателя в резонансных единицах (сокращенно: RU; ось Y) от времени (ось X).

5 Фиг. 3. Сортировка клона C8 антитела к IL-1RAP и клона C3 антитела к IL-1RAP по связываемому эпитопу человеческого белка IL-1RAP с применением биослойной интерферометрии на приборе компании Octet. Биотинилированный человеческий белок IL-1RAP-avi-his наносили на биосенсор SA, покрытый стрептавидином. Fab-фрагмент анти-C8 к IL-1RAP вводили в раствор над иммобилизованным человеческим IL-1RAP в концентрации 200 нМ в буфере для оценки кинетики до насыщения всех мест
10 связывания на поверхности. Потом в раствор над поверхностью с полным насыщением мест связывания вводили предварительно смешанный раствор Fab-фрагмента анти-C3 к IL-1RAP и Fab-фрагмента анти-C8 к IL-1RAP в конечной концентрации 200 нМ каждого. Некоторые экспериментальные процедуры осуществляли с применением в качестве не блокирующего контроля Fab-фрагмента анти-E1 к IL-1RAP вместо Fab-фрагмента анти-C3 к IL-1RAP. На графиках продемонстрировано связывание с сенсорным
15 наконечником в виде зависимости сдвига длины волны (в нм; ось Y) от времени (ось X). Кривые обозначены названием клона конкурирующего Fab-фрагмента.

Фиг. 4. Измерение связывания анти-C8-RecC-ES IgG1 LALA к IL-1RAP с IL-1RAP человека и яванского макака методом поверхностного плазмонного резонанса. Анти-C8-RecC-ES IgG1 LALA к IL-1RAP иммобилизовали на сенсорном чипе серии S CM5, покрытом антителами к области Fc человеческого IgG.
20 Человеческий IL-1RAP-avi-his или IL-1RAP-avi-his яванского макака вводили в раствор над иммобилизованным IgG1 LALA в серии разведений в буфере HBS-EP+ с разными концентрациями. Представлен один пример из повторностей для (A) человеческого IL-1RAP и (B) IL-1RAP яванского макака. Данные на графиках представлены как зависимость количественного показателя в резонансных единицах (сокращенно: RU; ось Y) от времени (с, ось X). Пунктирными линиями показаны данные измерения, а сплошными линиями — подобранные модельные кривые. KD: равновесная константа
25 диссоциации; Ka: константа ассоциации; Kd: константа диссоциации.

Фиг. 5. Измерение связывания мышинового анти-C3-A3 IgG2a LALA к IL-1RAP с мышинным IL-1RAP методом поверхностного плазмонного резонанса. Мышиное анти-C3-A3 IgG2a LALA к IL-1RAP иммобилизовали на сенсорном чипе серии S CM5, покрытом антителами к области Fc мышинового IgG.
30 Мышиный IL-1RAP-his вводили в раствор над иммобилизованным IgG2a LALA в серии разведений в буфере HBS-EP+ с разными концентрациями. Представлен один пример повторности. Данные на графиках представлены как зависимость количественного показателя в резонансных единицах (сокращенно: RU; ось Y) от времени (с, ось X). Пунктирными линиями показаны данные измерения, а сплошными линиями — подобранные модельные кривые. KD: равновесная константа диссоциации; Ka: константа ассоциации; Kd: константа диссоциации.
35

Фиг. 6. Кандидатное антитело (кандидат) 1 к человеческому IL-1RAP специфически связывается с IL-1RAP человека и яванского макака. Для определения зависимости эффекта от дозы кандидат 1 к человеческому IL-1RAP (●) или изотипический контроль 3 (■) инкубировали с различными клеточными

линиями и типами клеток. Связанные антитела обнаруживали с помощью второго антитела — моноклонального анти-PE-Cyapine7 к человеческому IgG. На графиках показаны нелинейные сигмоидальные регрессионные кривые связывания (относительная геометрическая средняя интенсивность флуоресценции) для каждой клеточной линии. Каждая экспериментальная точка

5 представляет собой измеренный показатель для данной клеточной линии. Было выполнено множество независимых экспериментов для нескольких доноров (HaCaT и HaCaT IL-1RAP KO: 4 и 3 независимых эксперимента; фибробласты кожи человека: 2 независимых эксперимента, суммарно 5 доноров; нейтрофилы человека: 2 эксперимента, суммарно 6 доноров; фибробласты кожи яванского макака: 2 независимых эксперимента, суммарно 4 донора).

10 Фиг. 7. Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует высвобождение цитокинов, индуцируемое как IL-1, так и IL-36, в анализе стимуляции клеток HaCaT. Для определения зависимости эффекта от дозы кандидат 1 к человеческому IL-1RAP (●) или изотипический контроль 3 (■) инкубировали с клеточной

линией стимулированных IL-1 β или IL-36 γ клеток HaCaT дикого типа. На графиках показаны нелинейные

15 IL-36 γ). Каждая экспериментальная точка представляет собой измеренный показатель для независимого эксперимента. Проводили два независимых эксперимента.

Фиг. 8. Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует индуцированное IL-33 высвобождение цитокинов в анализе стимуляции человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Для определения зависимости эффекта от дозы кандидата 1 к человеческому IL-1RAP (●) или

20 изотипический контроль 3 (■) инкубировали со стимулированными IL-1 β или IL-12+IL-33 клетками hPBMC (человеческими PBMC). На графиках показаны объединенные нелинейные сигмоидальные регрессионные кривые ингибирования для каждого стимулирующего агента (IL-1 β или IL-12+IL-33). Каждая кривая представляет объединенные данные от 3 доноров. Проводили два независимых эксперимента.

25 Фиг. 9. Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует высвобождение цитокинов в анализе повторной стимуляции в цельной крови при комбинированной цитокиновой стимуляции. Кандидата 1 к человеческому IL-1RAP (●) или изотипический контроль 3 (■) инкубировали в человеческой цельной

30 крови с комбинацией IL-1 α , IL-1 β , IL-12, IL-33, IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ . На графиках показано влияние комбинации на высвобождение цитокинов и хемокинов и эффект кандидата 1 к человеческому IL-1RAP на каждый определяемый показатель либо для высвобождения растворимых маркеров (A, B, C), либо для нормализованных данных по ингибированию (D). Каждая точка представляет собой измеренный показатель для одного донора. Проводили восемь независимых экспериментов. НЗ означает «не значимый»; * для $0,01 < p < 0,05$; ** для $0,001 < p < 0,01$; * для $p < 0,001$.

35 Фиг. 10. Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует активацию нейтрофилов при инкубации с кондиционированной HaCaT средой после стимуляции IL-1 β и IL-36 γ . Кандидата 1 к человеческому IL-1RAP (●) или изотипический контроль 3 (■) инкубировали с клеточной линией стимулированных IL-1 β или IL-36 γ клеток HaCaT дикого типа. Через 24 ч после стимуляции кондиционированную среду собирали и инкубировали со свежесыведенными нейтрофилами. На графиках показан эффект кандидата 1 к

человеческому IL-1RAP на процентную долю активированных нейтрофилов. Каждая точка представляет собой измеренный показатель для одного донора. Проводили три независимых эксперимента суммарно с 9 донорами. НЗ означает «не значимый»; * для $0,01 < p < 0,05$; ** для $0,001 < p < 0,01$; * для $p < 0,001$.

5 Фиг. 11. Кандидат 1 к мышинному IL-1RAP специфически связывается с мышинным IL-1RAP. Для определения зависимости эффекта от дозы кандидата 1 к человеческому IL-1RAP (●) или изотипический контроль 3 (■) инкубировали с различными клеточными линиями и типами клеток. Связанные антитела обнаруживали с помощью второго антитела — моноклонального анти-PE-Cyapine7 к человеческому IgG. На графиках показаны нелинейные сигмоидальные регрессионные кривые связывания (относительная геометрическая средняя интенсивность флуоресценции) для каждой клеточной линии. Каждая
10 экспериментальная точка представляет собой измеренный показатель для данной клеточной линии. Было выполнено множество независимых экспериментов для нескольких доноров (HaCaT и HaCaT IL-1RAP KO: 4 и 3 независимых эксперимента; фибробласты кожи человека: 2 независимых эксперимента, суммарно 5 доноров; нейтрофилы человека: 2 эксперимента, суммарно 6 доноров; фибробласты кожи яванского макака: 2 независимых эксперимента, суммарно 4 донора).

15 Фиг. 12. Кандидат 1 к мышинному IL-1RAP ингибирует высвобождение цитокинов, индуцируемое как IL-33, так и IL-36, в анализе стимуляции клеток NIH-3T3. Для определения зависимости эффекта от дозы кандидата 1 к мышинному IL-1RAP (●) или изотипический контроль 2 (■) инкубировали со стимулированными mIL-1 β , hIL-33 или mIL-36 клетками NIH-3T3. На графиках показаны нелинейные сигмоидальные регрессионные кривые ингибирования для каждого стимулирующего агента. Каждая
20 экспериментальная точка представляет один результат измерения.

Фиг. 13. Кандидат 1 к мышинному IL-1RAP ингибирует высвобождение IL-5 в мышинной сыворотке через 24 ч после введения интерлейкинов. Мышам линии C57BL/6JRj вводили интраперитонеально различные препараты в день 0. Через два часа после введения препаратов мышам вводили интраперитонеально смесь интерлейкинов (мышинный IL-1 бета, человеческий IL-33 и мышинный IL-36 альфа, бета и гамма). Через
25 24 ч после первого введения препаратов проводили эвтаназию мышей. Собирали мышиную сыворотку для анализа Lumiplex. Количественное определение высвобождения IL-5. Данные исследования Bely_4.

Фиг. 14. Кандидат 1 к мышинному IL-1RAP ингибирует высвобождение IL-5 в мышинной сыворотке через 72 ч после введения интерлейкинов. Мышам линии C57BL/6JRj вводили интраперитонеально различные препараты в день 0, день 1 и день 2. Через два часа после введения препаратов мышам вводили
30 интраперитонеально смесь интерлейкинов (мышинный IL-1 бета, человеческий IL-33 и мышинный IL-36 альфа, бета и гамма). Через 72 ч после первого введения препаратов проводили эвтаназию мышей. Собирали мышиную сыворотку для анализа Lumiplex. Количественное определение высвобождения IL-5.

Данные исследования Bely_5.

Фиг. 15. Кандидат 1 к мышинному IL-1RAP ингибирует высвобождение Gro-альфа в мышинной сыворотке
35 через 72 ч после введения интерлейкинов. Мышам линии C57BL/6JRj вводили интраперитонеально различные препараты в день 0, день 1 и день 2. Через два часа после введения препаратов мышам вводили

интраперитонеально смесь интерлейкинов (мышинный IL-1 бета, человеческий IL-33 и мышинный IL-36 альфа, бета и гамма). Через 72 ч после первого введения препаратов проводили эвтаназию мышей. Собирали мышиную сыворотку для анализа Lumindex. Количественное определение высвобождения Gro-альфа. Данные исследования Bely_5.

5 Фиг. 16. Кандидат 1 к мышиному IL-1RAP индуцировал значимое снижение образования псориазических чешуек и оценки поражения в модели псориазоподобного воспаления кожи. На спины и оба уха мышей со сбритой шерстью ежедневно наносили местно 5% крем IMQ (Aldara®); IMQ наносили в течение от 7 до 14 последовательных дней. На обработанные IMQ участки кожи накладывали стерильную непрозрачную повязку Tegaderm™ для защиты нанесенного местно крема. Введение мышам препаратов
10 внутрибрюшинным путем введения осуществляли раз в три дня в случае всех молекул, кроме анакинры, которую вводили внутрибрюшинным путем введения ежедневно. Ежедневно проводили физикальное обследование мышей и определяли оценку PASI (индекс площади поверхности псориаза и степени тяжести) следующим образом: эритема (раздражение/покраснение кожи) и образование струпуев (1–4 балла) / образование псориазических чешуек и шкала степени тяжести поражения (1–4 балла). Данные
15 исследования IMQ_s2.

Фиг. 17. Кандидат 1 к мышиному IL-1RAP ингибирует инфильтрацию нейтрофилами в мышинной модели псориазоподобного воспаления кожи. На спины и оба уха мышей со сбритой шерстью ежедневно наносили местно 5% крем IMQ (Aldara®); IMQ наносили в течение двенадцати последовательных дней. На обработанные IMQ участки кожи накладывали стерильную непрозрачную повязку Tegaderm™ для
20 защиты нанесенного местно крема. Введение мышам препаратов внутрибрюшинным путем введения осуществляли раз в три дня в случае всех молекул, кроме анакинры, которую вводили внутрибрюшинным путем введения ежедневно. Ежедневно проводили физикальное обследование мышей и определяли оценку PASI (индекс площади поверхности псориаза и степени тяжести) следующим образом: эритема (раздражение/покраснение кожи) и образование струпуев (1–4 балла) / образование псориазических
25 чешуек и шкала степени тяжести поражения (1–4 балла). В конце исследования проводили иммуногистохимический (ИГХ) анализ кожи спины. Количественную оценку акантоза проводили на 4 пробах кожи на одно предметное стекло на одну мышь/по 10 изображений на предметное стекло. Данные исследования IMQ_s2.

Фиг. 18. Изображения по результатам гистологического исследования проб кожи спины мышей. Мышам
30 вводили препараты имиквимод и PBS (A), изотипический контроль 3 (B), кандидат 1 к мышиному IL-1RAP в дозе 1 мг (C) кандидат 1 к мышиному IL-1RAP в дозе 250 мкг (D), анакинру (E), mIL36Ra (F) или не вводили препараты (G). Данные исследования IMQ_s2.

Фиг. 19. (A) Для определения зависимости эффекта от дозы кандидата 1 к человеческому IL-1RAP (●) или
35 максимальную дозу изотипического контроля 4 (■) инкубировали в человеческой цельной крови с 5 нг/мл IL-1 α или 5 нг/мл IL-1 β . На графиках показано ингибирующее действие кандидата 1 к человеческому IL-1RAP на каждый определяемый показатель. Каждая точка представляет среднее ингибирование в процентах \pm доверительный интервал для доноров, которые продемонстрировали индекс стимуляции более 3 раз относительно исходного уровня (SI > 3). Проводили три независимых эксперимента суммарно

с 15 донорами. (В) В таблице приведено количество ответивший на лечение доноров ($SI > 3$ по сравнению с исходным уровнем), чьи данные включены в графики, для каждого стимулирующего агента и каждого определяемого показателя среди всех изученных 15 доноров.

5 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее описание относится к антителам, включая гуманизированные антитела, которые специфически связываются с человеческим IL1RAP с высокой аффинностью. Описанные антитела к IL1RAP способны снижать, ингибировать и/или полностью блокировать внутриклеточную передачу сигнала через IL1RAP-опосредуемые пути, включая сигнальные пути IL-1, IL-33 и/или IL-36. В частности, антитела к IL1RAP, описанные в настоящем документе, способны снижать, ингибировать и/или полностью блокировать передачу сигнала, стимулируемую связыванием одного или более из следующих агонистов: IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ . Настоящее описание также относится к применениям антител к IL1RAP в способах лечения IL1RAP-опосредованных заболеваний, включая заболевания и состояния, отвечающие на ингибирование передачи сигналов от IL-1, IL-33 и/или IL-36, включая, без ограничений, различные онкологические заболевания (например, рак молочной железы, колоректальный рак, немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы), а также воспалительные, инфекционные и аутоиммунные заболевания.

Обзор терминологии и методик

В описаниях в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, используемый термин «белок» включает в себя более чем один белок, а используемый термин «соединение» относится к более чем одному соединению. Термины «содержать», «содержит», «содержащий», «включать», «включает» и «включающий» используются как взаимозаменяемые и не подразумевают ограничительного характера. Следует также понимать, что в тех случаях, когда в описаниях различных вариантов осуществления используется термин «содержащий», специалистам в данной области будет очевидно, что в некоторых конкретных случаях тот или иной вариант осуществления может альтернативно описываться с использованием формулировок «состоящий по существу из» или «состоящий из».

Если приводится диапазон значений и если контекст явным образом не обуславливает иное, следует понимать, что каждое промежуточное целочисленное значение и каждое значение десятичной дроби промежуточного целого числа, если контекстом явно не указывается иное, между верхним и нижним пределами этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в этом указанном диапазоне включены в изобретение. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в изобретение при наличии любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон значений включает один или оба этих предельных значения, диапазоны, исключаящие (i) любой из двух или (ii)

оба этих предельных значения, также включены в объем изобретения. Например, «от 1 до 50» включает «от 2 до 25», «от 5 до 20», «от 25 до 50» «от 1 до 10» и т. д.

По существу, номенклатура, используемая в настоящем документе, и методики и процедуры, описанные в настоящем документе, включают номенклатуру, методики и процедуры, хорошо известные и часто применяемые специалистами в данной области, такие как стандартные методики и методы, описанные в публикациях: Sambrook et al., *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 (далее Sambrook); *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (supplemented through 2011) (далее Ausubel); *Antibody Engineering*, Vols. 1 and 2, R. Kontermann and S. Dubel, eds., Springer- Verlag, Berlin and Heidelberg (2010); *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols*, V. Ossipow and N. Fischer, eds., 2nd Ed., Humana Press (2014); *Therapeutic Antibodies: From Bench to Clinic*, Z. An, ed., J. Wiley & Sons, Hoboken, N.J. (2009); и *Phage Display*, Tim Clackson and Henry B. Lowman, eds., Oxford University Press, United Kingdom (2004).

Все публикации, патенты, заявки на патенты или другие документы, процитированные в настоящем описании, фактически включены полностью путем ссылки для любых целей, в той же степени, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент или другой документ индивидуально включены путем ссылки для всех целей.

Все применяемые в настоящем документе технические и научные термины, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное рядовому специалисту в области, к которой относится изобретение. Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины предназначены только для описания конкретных вариантов осуществления и не имеют ограничительного характера. Для целей интерпретации настоящего описания будут применяться приведенные ниже определения терминов, и в соответствующих случаях термин, используемый в единственном числе, будет также включать множественное число, и наоборот.

При использовании в настоящем документе IL1RAP означает вспомогательный белок рецептора интерлейкина-1, который является корецептором клеточной мембраны для нескольких рецепторов цитокинов семейства IL-1, включая рецептор 1 интерлейкина-1 (IL1R1), ST2 (также известный как белок 1, подобный рецептору интерлейкина-1, или IL1RL1) и белок 2, подобный рецептору интерлейкина-1 (IL1RL2). Следует отметить, что вспомогательный белок рецептора интерлейкина-1, или IL1RAP, иногда называют в данной области IL-1RAP, IL-1RAcP, IL1RAcP или IL-1R3. Термины IL1RAP, IL-1RAP и «белок IL1RAP» используются в настоящем документе как взаимозаменяемые.

Термины «IL1RAP-опосредованное состояние» или «IL1RAP-опосредованное заболевание» при использовании в настоящем документе включают любое медицинское состояние, ассоциированное с аномальным функционированием сигнальных путей, опосредуемых цитокинами семейства IL-1 вместе с IL1RAP, действующим в качестве корецептора, включая, без ограничений, нижележащие сигнальные пути, стимулируемые цитокинами семейства IL-1 — IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ . Например, IL1RAP-опосредованные заболевания могут включать, без ограничений, заболевания,

опосредованные антагонистами или ингибиторами сигнальных путей IL-1, IL-33 и/или IL-36 и/или отвечающие на антагонисты или ингибиторы сигнальных путей IL-1, IL-33 и/или IL-36, включая онкологические, воспалительные, инфекционные и аутоиммунные заболевания. В частности, IL1RAP-опосредованное заболевание может включать, без ограничений, акне, острый тяжелый язвенный колит, болезнь Стилла взрослых, аллергический ринит, подагрический артрит, ювенильный артрит, остеоартрит, ревматоидный артрит, системный склероз, боль при артрите, астму, атеросклероз, атопическую экзему, болезнь Бехчета, кахексию, рак молочной железы, колоректальный рак, немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, хроническую обструктивную болезнь легких, синдром сухого глаза, семейный холодовой аутовоспалительный синдром, семейную средиземноморскую лихорадку, пищевую аллергию, генерализованный пустулезный псориаз, гнойный гидраденит, синдром гипериммуноглобулинемии D, гиперурикемию, синдром Макла — Уэллса, мультисистемное воспалительное заболевание неонатального возраста, скелетно-мышечную боль, ладонно-подошвенный пустулез, заболевание периферических сосудов, ревматическую полимиалгию, полип носа, псориаз, гангренозную пиодермию, рестеноз, серповидно-клеточную анемию, синусит, периодический синдром, ассоциированный с мутацией гена рецептора TNF, сахарный диабет 2-го типа и язвенный колит.

«Сигнал, стимулированный IL-1» при использовании в настоящем документе означает внутриклеточный сигнал, инициируемый связыванием цитокина IL-1, такого как IL-1 α или IL-1 β , с его соответствующим поверхностным рецептором клеток, IL1R1. Примеры сигналов, стимулированных IL-1, включают сигналы, поддающиеся измерению с применением клеточного анализа блокировки, такого как описанный в примерах в настоящем документе.

«Сигнал, стимулированный IL-33» при использовании в настоящем документе означает внутриклеточный сигнал, инициируемый связыванием цитокина IL-33, такого как IL-33, с его соответствующим поверхностным рецептором клеток IL1RL1 (также известным как ST2). Примеры сигналов, стимулированных IL-33, включают сигналы, поддающиеся измерению с применением клеточного анализа блокировки, такого как описанный в примерах в настоящем документе.

«Сигнал, стимулированный IL-36» при использовании в настоящем документе означает внутриклеточный сигнал, инициируемый связыванием цитокина IL-36, такого как IL-36 α , IL-36 β или IL-36 γ , с его соответствующим поверхностным рецептором клеток, IL1RL2. Примеры сигналов, стимулированных IL-36, включают сигналы, поддающиеся измерению с применением клеточных анализов блокировки, таких как описанные в примерах настоящего документа.

«Клеточный анализ блокировки» означает анализ, в котором можно измерить способность антитела ингибировать или снижать биологическую активность антигена, с которым оно связывается. Например, клеточный анализ блокировки можно применять для измерения концентрации антитела, необходимой для ингибирования специфической биологической или биохимической функции, такой как IL1RAP-опосредуемая внутриклеточная передача сигнала через сигнальные пути IL-1, IL-33 и IL-36. В некоторых вариантах осуществления полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC50) антитела и/или концентрацию антитела, вызывающую ингибирование на 90% (IC90) (например, антитела к IL1RAP по

настоящему описанию), измеряют с применением клеточного анализа блокировки. В некоторых вариантах осуществления клеточный анализ блокировки применяют для определения того, блокирует ли антитело взаимодействие между агонистом (например, IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ) и его когнатным рецептором. Клеточный анализ блокировки, используемый с антителами настоящего описания, может включать анализ первичных клеток (например, клеток HaCaT), а также репортерный или сенсорный клеточный анализ. В настоящем документе приведены примеры клеточного анализа блокировки для сигнальных путей IL-1, IL-33 и IL-36, такие как описанные в разделе примеров.

«Антитело» при использовании в настоящем документе означает молекулу, содержащую одну или более полипептидных цепей, которая специфически связывается с определенным антигеном или опосредует иммунологическую реакцию в отношении определенного антигена. Примеры антител настоящего описания включают моноклональные антитела, поликлональные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, мультиспецифические антитела (или гетероконъюгаты) (например, биспецифические антитела), одновалентные антитела (например, антитела с одним Fab-фрагментом), поливалентные антитела, антиген-связывающие фрагменты (например, фрагменты Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG и scFv), антитела, слитые с другими белками, и синтетические антитела (или миметики антител).

«Антитело к IL1RAP» или «антитело, которое связывается с IL1RAP», означает антитело, которое связывается с IL1RAP с существенной аффинностью, таким образом, что антитело можно применять в качестве диагностического и/или терапевтического агента при нацеливании на IL1RAP. В некоторых вариантах осуществления степень связывания антитела к IL1RAP с неродственным антигеном, не являющимся IL1RAP, составляет менее примерно 10% от связывания антитела с IL1RAP по результатам измерения, например методом радиоиммунологического анализа (RIA). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с IL1RAP, имеет константу диссоциации (KD) < 1 пМ, < 100 нМ, < 10 нМ, < 1 нМ, < 0,1 нМ, < 0,01 нМ или < 1 пМ (например, 10⁻⁸ М или менее, например от 10⁻⁸ М до 10⁻¹³ М, например от 10⁻⁹ М до 10⁻¹³ М).

«Полноразмерное антитело», «интактное антитело» или «целое антитело» используются в настоящем документе как взаимозаменяемые для обозначения антитела, имеющего структуру, в существенной степени схожую со структурой нативного антитела, или содержащего тяжелые цепи, которые включают область Fc, как указано в настоящем документе.

«Фрагмент антитела» означает часть полноразмерного антитела, которая способна связываться с тем же антигеном, что и полноразмерное антитело. Примеры фрагментов антител включают, без ограничений, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; одновалентные, или имеющие один Fab-фрагмент, антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

«Класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, входящих в состав его тяжелой цепи. Существуют пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них дополнительно подразделяются на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначены как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно.

«Вариабельная область» или «вариабельный домен» означает домен тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела по существу имеют схожие структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три гипервариабельные области (CDR) (см., например, Kindt et al., *Ruby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91). Для обеспечения специфичности связывания с антигеном может быть достаточно единичного домена VH или VL. Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, можно выделить, применяя домен VH или VL из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH соответственно (см., например, публикации: Portolano et al., *J. Immunol.*, 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)).

Термин «гипервариабельная область» или «CDR» при использовании в настоящем документе означает каждую из областей вариабельного домена антитела, последовательность которых является гипервариабельной и/или которые образуют структурно сформированные петли («гипервариабельные петли»). По существу, нативные антитела содержат четыре цепи с шестью CDR; три в вариабельном домене тяжелой цепи, VH (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), и три в вариабельном домене легкой цепи, VL (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). CDR обычно содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель и/или из «определяющих комплементарность областей» (CDR). Если не указано иное, остатки CDR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки в FR) пронумерованы в настоящем документе в соответствии с публикацией Rabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).

«Определяющая комплементарность область», или «CDR», при использовании в настоящем документе означает области в составе CDR вариабельного домена, которые имеют наибольшую вариабельность последовательности и/или участвуют в распознавании антигена. По существу, нативные антитела содержат четыре цепи с шестью CDR; три в вариабельных доменах тяжелой цепи, VH (H1, H2, H3), и три в вариабельных доменах легкой цепи, VL (L1, L2, L3). Примеры областей CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) находятся в положениях аминокислотных остатков 24–34 в составе L1, 50–56 в составе L2, 89–97 в составе L3, 26–35 или 31–35 в составе H1, 50–65 или 50–65 в составе H2 и 93–102 или 95–102 в составе H3. (Rabat et al., выше). Помимо способов, опубликованных в Rabat et al., (выше), где были собраны и выровнены последовательности различных членов иммуноглобулинового суперсемейства, были предложены альтернативные методы, такие как представленные в публикациях Chothia et al., (*Chothia - J Mol Biol.* 1987 Aug 20;196(4):901-17, *Nature.* 1989 Dec 21- 28;342(6252):877-83) и Lefranc et al., (*IMGT - Nucleic Acids Res.* 1999 Jan 1;27(1):209-12.), где предложена унифицированная схема нумерации для последовательностей вариабельных доменов иммуноглобулинов зародышевой линии. Все такие альтернативные методы определения включены в настоящее изобретение, и последовательности, приведенные в настоящем описании изобретения, не предназначены для того, чтобы исключить последовательности CDR, определенные в соответствии с альтернативным методом, которые могут

содержать только часть последовательностей CDR, представленных в списке последовательностей. В частности, последовательности CDR в соответствии с Chothia et al. находятся в положениях аминокислотных остатков 26–31 в составе H1, 52–65 в составе H2 и 95–102 в составе H3;

5 В частности, последовательности CDR в соответствии с LeFranc et al. находятся в положениях аминокислотных остатков 27–38 в составе H1, 56–65 в составе H2 и 105–117 в составе H3.

Термин «каркас», или FR, означает остатки варибельного домена, отличные от остатков гиперварибельной области (CDR). FR варибельного домена по существу состоит из четырех доменов FR: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности CDR и FR по существу расположены в составе VH (или VL) в следующем порядке: FR1-H1 (L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

10 «Нативное антитело» означает молекулу иммуноглобулина природного происхождения. Например, нативные антитела IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины около 150 000 Дальтон, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, которые соединены дисульфидными связями. В направлении от N- к C-концу каждая тяжелая цепь содержит варибельную область (VH), также называемую тяжелым варибельным доменом или варибельным доменом тяжелой
15 цепи, за которой следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогично в направлении от N- к C-концу каждая легкая цепь содержит варибельную область (VL), также называемую легким варибельным доменом или варибельным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен (CL). Легкая цепь антитела может быть отнесена к одному из двух типов, каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности ее константного домена.

20 «Моноклональное антитело» при использовании в настоящем документе относится к антителу, полученному из по существу однородной популяции антител, т. е. популяции, состоящей из индивидуальных антител, которые идентичны друг другу и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител (например, вариантов антител, содержащих мутации, встречающиеся в природе или возникающие в ходе получения моноклональных антител; обычно такие
25 варианты присутствуют в небольших количествах). В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, содержат различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело в препарате моноклональных антител направлено против единственной детерминанты на антигене. Таким образом, термин «моноклональное» указывает на определенную особенность антитела — что оно было получено из по существу однородной популяции
30 антител, и не подразумевает, что требуется какой-либо конкретный способ получения антитела. Например, моноклональные антитела для применения могут быть получены с применением различных способов, включая, без ограничений, гибридомный способ, способы рекомбинантных ДНК, способы фагового дисплея и способы с применением трансгенных животных, содержащих весь или часть иммуноглобулинового локуса человека; эти способы и другие примеры способов получения
35 моноклональных антител описаны в настоящем документе.

«Химерное антитело» означает антитело, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из определенного источника или биологического вида, тогда как оставшаяся часть тяжелой и/или легкой

цепи происходит из другого источника или биологического вида.

«Гуманизированное антитело» означает химерное антитело, содержащее аминокислотные последовательности из CDR, не принадлежащих человеку, и аминокислотные последовательности из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело будет содержать по
5 существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, причем все или по существу все из CDR (например, CDR) соответствуют таковым в нечеловеческом антителе, а все или по существу все FR соответствуют таковым в человеческом антителе. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящей из человеческого антитела. «Гуманизированная форма» антитела, например нечеловеческого антитела,
10 означает антитело, которое было подвергнуто гуманизации.

«Человеческое антитело» означает антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, соответствующую таковой у антитела, вырабатываемого человеческим организмом или человеческой клеткой, либо полученного из источника, не являющегося человеком, где используют репертуары человеческих антител или другие последовательности, кодирующие человеческие антитела. Из данного
15 определения человеческого антитела, в частности, исключено гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

«Человеческий консенсусный каркас» представляет собой каркас, который содержит аминокислотные остатки, наиболее часто встречающиеся в выбранных каркасных последовательностях VL или VH человеческих иммуноглобулинов. По существу, выбор последовательностей VL или VH человеческих
20 иммуноглобулинов осуществляют из подгруппы последовательностей переменных доменов. По существу, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, описанную в Rabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3. В одном варианте осуществления в случае VL подгруппой является подгруппа каппа I из Rabat et al. (выше). В одном варианте осуществления в случае VH подгруппой является подгруппа III из Rabat et al. (выше).
25

«Человеческий акцепторный каркас» при использовании в настоящем документе означает каркас, содержащий аминокислотную последовательность каркаса переменного домена легкой цепи (VL) или каркаса переменного домена тяжелой цепи (VH), полученный из каркаса человеческого иммуноглобулина или из человеческого консенсусного каркаса. Человеческий акцепторный каркас,
30 «полученный из» каркаса человеческого иммуноглобулина или из человеческого консенсусного каркаса, может содержать ту же аминокислотную последовательность, или он может содержать изменения аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления число аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В некоторых вариантах осуществления человеческий акцепторный
35 каркас VL идентичен по последовательности каркасу VL человеческого иммуноглобулина или человеческому консенсусному каркасу.

«Область Fc» означает димерный комплекс, содержащий C-концевые полипептидные

последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина, причем С-концевая полипептидная последовательность представляет собой последовательность, которую можно получить путем переваривания интактного антитела папаином. Область Fc может содержать нативные последовательности Fc или варианты последовательностей Fc. Хотя границы последовательности Fc тяжелой цепи иммуноглобулина можно варьировать, как правило, считается, что последовательность области Fc тяжелой цепи человеческого IgG проходит от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от положения примерно Pro230 до карбоксильного конца последовательности Fc в положении Lys447. Однако С-концевой лизин (Lys447) последовательности Fc может присутствовать или не присутствовать в области Fc рекомбинантных антител из-за ферментативного расщепления, которое может происходить в системах культур клеток, применяемых для получения рекомбинантных белков (например, получение в клетках CHO). Последовательность Fc иммуноглобулина по существу содержит два константных домена, домен CH2 и домен CH3, и необязательно содержит домен CH4.

«Fc-рецептор», или FcR, означает рецептор, который связывается с областью Fc антитела. В некоторых вариантах осуществления FcR представляет собой нативный человеческий FcR. В некоторых вариантах осуществления FcR является таким рецептором, который связывается с антителом IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты этих рецепторов и их формы, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые обладают схожими аминокислотными последовательностями, различающимися в основном своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) (см, например, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). При использовании в настоящем документе FcR также включает неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976) и Kim et al., *Eur. J. Immunol.*, 24:2429-2434 (1994)) и регуляцию гомеостаза иммуноглобулинов. FcR рассматривают, например, в публикациях Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995).

«Поливалентное антитело» при использовании в настоящем документе означает антитело, содержащее три или более антигенсвязывающих сайтов. Поливалентное антитело предпочтительно создано генно-инженерными методами таким образом, что содержит три или более антигенсвязывающих сайтов и по существу не является нативной последовательностью антитела IgM или IgA.

«Мультиспецифическое антитело» представляет собой антитело, имеющее по меньшей мере два различных сайта связывания, каждый сайт с отличающейся специфичностью связывания. Мультиспецифическое антитело может быть полноразмерным антителом или фрагментом антитела, и каждый из различных сайтов связывания может связываться с отличным антигеном либо различные сайты связывания могут связываться с двумя разными эпитопами одного и того же антигена.

«Фрагмент Fv» означает фрагмент антитела, который содержит полный антигенраспознающий и

антигенсвязывающий сайт. Эта область состоит из димера из одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи, находящихся в тесной ассоциации, которая может быть ковалентной по природе, например, в scFv. Именно в этой конфигурации три CDR каждого переменного домена взаимодействуют с образованием антигенсвязывающего сайта на поверхности димера VH-VL. В целом шесть CDR или их подгруппа придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных к антигену) способен распознавать антиген и связываться с антигеном, хотя и обычно с более низкой аффинностью, чем полный сайт связывания.

«Fab-фрагмент» означает фрагмент антитела, который содержит переменный и константный домен легкой цепи и переменный домен и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. «Фрагменты F(ab')₂» содержат пару Fab-фрагментов, которые по существу ковалентно связаны друг с другом рядом с их карбоксильными концами через остатки цистеина в шарнирных областях. Специалистам в данной области известны также другие способы химического соединения фрагментов антитела.

«Антигенсвязывающая рука» при использовании в настоящем документе означает компонент антитела, который способен специфически связываться с целевой молекулой, представляющей интерес. Как правило, антигенсвязывающая рука представляет собой комплекс полипептидных последовательностей иммуноглобулина, например последовательностей CDR и/или переменного домена легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина.

Термин «одноцепочечные Fv», или scFv, означает фрагменты антител, содержащие домены антитела VH и VL, причем данные домены присутствуют в одной полипептидной цепи. По существу, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, что позволяет scFv формировать требуемую структуру для связывания с антигеном.

Термин «диатела» означает небольшие фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, причем данные фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL), в одной и той же полипептидной цепи (VH и VL). С помощью линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить образование пары между двумя доменами в одной и той же цепи, домены принуждают образовывать пару с комплементарными доменами другой цепи, создавая таким образом два антигенсвязывающих сайта.

Термин «линейные антитела» означает антитела, описанные в Zapata et al., Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995). Вкратце, эти антитела содержат тандемные повторы фрагментов тяжелой цепи (VH-CH1-VH-CH1), которые совместно с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей. Линейные антитела могут быть биспецифическими или моноспецифическими.

«Голое антитело» означает антитело, которое не конъюгировано с гетерологичным фрагментом (например, цитотоксичным фрагментом) или радиоактивной меткой.

«Аффинность» означает силу всех нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитело) и его партнером по связыванию (например, антиген). «Аффинность связывания» относится к собственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1 : 1 между участниками пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y, как правило, может быть выражена равновесной константой диссоциации (KD). Аффинность можно измерять с помощью известных в данной области способов, включая описанные в настоящем документе. Конкретные иллюстративные и примерные варианты осуществления для измерения аффинности связывания описаны ниже.

«Специфически связывается» или «специфическое связывание» означает связывание антитела с антигеном со значением аффинности не более примерно 1×10^{-7} M.

Антитело «с созревшей аффинностью» означает антитело с одним или более изменениями в одной или более CDR по сравнению с исходным антителом, в котором отсутствуют такие изменения, при этом данные изменения приводят к улучшению аффинности антитела к антигену.

«Функциональный антигенсвязывающий сайт» антитела представляет собой сайт, который способен связываться с целевым антигеном. Аффинность связывания антигена, присущая антигенсвязывающему сайту, не обязательно является столь же сильной, как у исходного антитела, из которого получен антигенсвязывающий сайт, но способность связываться с антигеном должна поддаваться измерению с применением любого из различных известных методов оценки связывания антитела с антигеном.

«Выделенное антитело» означает антитело, которое было отделено от компонента его природной среды. В некоторых вариантах осуществления антитело очищено до степени чистоты более 95% или 99% согласно определению, например, с применением электрофореза (например, SDS-PAGE, изоэлектрофокусирования (ИЭФ), капиллярного электрофореза) или хроматографии (например, ионообменной или обратно-фазовой ВЭЖХ). Обзор способов оценки степени очистки антител см., например, в публикации Flatman et al., J. Chromatogr. B Analyt. Technol Biomed Life Sci, 848:79-87.

«По существу схожие» или «по существу те же» при использовании в настоящем документе означает достаточно высокую степень сходства между двумя численными значениями (например, одним, связанным с тестовым антителом, и другим, связанным с эталонным антителом) таким образом, что специалист в данной области сделает вывод, что различие между двумя значениями имеет малую биологическую и/или статистическую значимость или не имеет биологической и/или статистической значимости в контексте биологической характеристики, измеряемой указанными значениями (например, значениями KD).

«По существу разные» при использовании в настоящем документе означает достаточно высокую степень различия между двумя численными значениями (обычно одним, связанным с молекулой, и другим, связанным с эталонной молекулой) таким образом, что специалист в данной области сделает вывод, что разница между двумя значениями имеет статистическую значимость в контексте биологической характеристики, измеряемой указанными значениями (например, значениями KD).

Термин «эффекторные функции» обозначает те биологические активности, свойственные области Fc антитела, которые варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание с C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC); связывание с Fc-рецептором; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; угнетение рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток); и активацию В-клеток.

«Иммуноконъюгат» означает антитело, конъюгированное с одной или более гетерологичными молекулами, включая, без ограничений, цитотоксический агент.

«Лечение», «лечить» или «осуществление лечения» означает клиническое вмешательство в попытке изменить естественное течение расстройства у индивидуума, подвергающегося лечению, которое может проводиться либо для профилактики, либо во время течения клинической патологии. Требуемые результаты лечения могут включать, без ограничений, предотвращение возникновения или рецидива расстройства, ослабление симптомов, уменьшение любых прямых или опосредованных патологических последствий расстройства, предотвращение образования метастазов, снижение скорости прогрессирования, уменьшение интенсивности или облегчение тяжести болезненного состояния и ремиссию или улучшенный прогноз. Например, лечение может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтического состава, содержащего антитело к IL1RAP, для отложенного развития или замедления прогрессирования заболевания или состояния, опосредуемого IL1RAP.

«Фармацевтический состав» означает препарат в такой форме, которая обеспечивает эффективное проявление биологической активности активного (-ых) ингредиента (-ов), и при этом данный препарат не содержит каких-либо дополнительных компонентов, которые токсичны для субъекта, которому вводят состав.

«Фармацевтически приемлемый носитель» означает ингредиент в фармацевтическом составе, отличный от активного ингредиента, который нетоксичен для введения субъекту. Фармацевтически приемлемый носитель может включать, без ограничений, буферный раствор, эксципиент, стабилизатор или консервант.

«Терапевтически эффективное количество» означает количество активного ингредиента или агента (например, фармацевтического состава) для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата, например для лечения или предотвращения заболевания, расстройства или состояния у субъекта. В случае IL1RAP-опосредованного заболевания или состояния терапевтически эффективным количеством терапевтического агента является количество, которое уменьшает, предотвращает, ингибирует и/или облегчает до некоторой степени один или более симптомов, ассоциированных с заболеванием, расстройством или состоянием. В случае лечения астмы эффективность *in vivo* можно измерить, например, путем оценки длительности, степени тяжести и/или рецидива симптомов, доли ответов (RR), продолжительность ответа и/или качества жизни.

«Одновременно» при использовании в настоящем документе означает введение двух или более

терапевтических агентов, при этом по меньшей мере часть введений совпадает по времени. Соответственно, одновременное введение включает схему дозирования, при которой введение одного или более агентов продолжается после прекращения введения одного или более других агентов.

5 «Индивидуум» или «субъект» означает млекопитающее, включая, без ограничений, домашних животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, человека и приматов, отличных от человека, таких как низшие обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс).

Аффинность связывания и ингибирование передачи сигналов в клетку антителами к IL1RAP

В некоторых вариантах осуществления антитела к IL1RAP, предложенные в настоящем документе, имеют равновесную константу диссоциации (KD) для связывания с человеческим IL1RAP < 100 нМ, < 10 нМ, < 1 нМ, $< 0,1$ нМ, $< 0,01$ нМ или $< 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В частности, в некоторых вариантах осуществления антитела к IL1RAP настоящего описания связываются с человеческим IL1RAP с аффинностью связывания 1×10^{-8} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 1×10^{-10} М или менее либо 1×10^{-11} М или менее. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания измеряют как равновесную константу диссоциации (KD) для связывания с полипептидом IL1RAP человека (SEQ ID NO: 1 или 6). По существу, аффинность связывания лиганда с его рецептором можно определить с применением любого из множества анализов, и она может быть выражена в терминах значений различных количественных оценок. Специфические для IL1RAP анализы связывания, используемые для определения аффинности антител, описаны в настоящем документе в разделе примеров. Кроме того, специалистам в данной области известны анализы связывания антител, и они могут быть использованы в настоящем документе, включая, без ограничений, любой анализ прямого или конкурентного связывания с применением таких методик, как вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализы, иммуноферментные анализы (ИФА), иммуноанализы типа «сэндвич», поверхностный плазмонный резонанс (такой как анализ BIAcore, описанный в WO2005/012359), анализы иммунопреципитации, флуоресцентные иммуноанализы и иммуноанализы с белком А.

25 Соответственно, в некоторых вариантах осуществления аффинность связывания выражена как значения KD и отражает собственную аффинность связывания (например, со сведенными к минимуму эффектами авидности). Антитела к IL1RAP настоящего описания проявляют сильную аффинность связывания с полипептидом IL1RAP человека (SEQ ID NO: 1 или 6), например, демонстрируя значения KD от 10 нМ до 1 пМ.

30 В некоторых вариантах осуществления антитела к IL1RAP, предложенные в настоящем документе, снижают, ингибируют и/или полностью блокируют внутриклеточную передачу сигнала через IL1RAP-опосредованные пути, включая сигнальные пути IL-1, IL-33 и/или IL-36, и, в частности, сигнальные пути, которые стимулируются связыванием одного или более из следующих агонистов: IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ . Способность антител ингибировать эти IL1RAP-опосредованные сигнальные пути можно проанализировать *in vitro*, применяя известные клеточные анализы блокировки, включая репортерные клеточные анализы и клеточные анализы блокировки с первичными клетками, описанные в разделе примеров в настоящем раскрытии. В некоторых вариантах осуществления способность антитела

снижать, ингибировать и/или полностью блокировать внутриклеточную передачу сигнала определяют как IC50 антитела, применяя репортерный клеточный анализ блокировки с агонистом (-ами) IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ в концентрации примерно EC50. EC50 агониста часто можно только приблизительно оценить перед анализом, и ее определяют после завершения анализа, используя нелинейный регрессионный анализ данных. В таких видах анализа значение примерно EC50, как правило, будет находиться в диапазоне от EC40–45 до EC55–60.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитела к IL1RAP настоящего описания характеризуются одним или более из следующих функциональных свойств, обусловленных способностью снижать, ингибировать и/или полностью блокировать внутриклеточную передачу сигнала через IL1RAP-опосредованные пути.

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP ослабляет стимулированный IL-1 сигнал, стимулированный IL-33 сигнал и/или стимулированный IL-36 сигнал на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления ослабление сигнала может быть измерено с применением репортерного клеточного анализа блокировки. Обычный специалист в данной области может выбрать любой из известных репортерных клеточных анализов, применяемых для определения ингибирования передачи сигналов в клетке через стимулированный IL-1, стимулированный IL-33 и/или стимулированный IL-36 путь. По существу, антитела к IL1RAP настоящего описания снижают IL1RAP-опосредованную внутриклеточную передачу сигналов, инициируемую связыванием агониста в концентрации примерно EC50 (например, от EC40 до EC60), со значением IC50 для антитела 10 нМ или менее, 5 нМ или менее или 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP ослабляет стимулированный IL-1 сигнал, стимулированный IL-33 сигнал и стимулированный IL-36 сигнал на по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%; причем необязательно стимулированные IL-1, IL-33 и/или IL-36 сигналы стимулированы агонистом, выбранным из IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ ; необязательно при этом при концентрации агониста примерно EC50 антитело имеет IC50 10 нМ или менее, 5 нМ или менее или 1 нМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP ослабляет внутриклеточный сигнал, инициированный связыванием одного или более из агонистов IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ с его когнатным рецептором, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP ингибирует стимулированное IL-1 α , IL-1 β и/или IL-36 β высвобождение IL8 из первичных человеческих фибробластов легких (PHLF); причем необязательно при концентрации IL-1 α , IL-1 β и/или IL-36 β примерно EC50 антитело имеет IC50 10 нМ или менее, 5 нМ или менее либо 1 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP ингибирует стимулированное IL-1 β высвобождение IL6 из первичных человеческих моноцитов; причем необязательно при концентрации IL-1 β примерно EC50 антитело имеет IC50 10 нМ или менее, 5 нМ или менее либо 1 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP ингибирует стимулированное IL-33 высвобождение INF- γ из человеческих натуральных киллерных (NK)

клеток; причем необязательно при концентрации IL-33 примерно EC50 антитело имеет IC50 10 нМ или менее, 5 нМ или менее либо 1 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело ингибирует стимулированное IL-36β высвобождение IL8 из человеческих эпидермальных кератиноцитов (HEKн); причем необязательно при концентрации IL-36β примерно EC60 антитело имеет IC50 10 нМ или менее, 5 нМ или менее либо 2 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело ингибирует стимулированное IL-33 фосфорилирование в базофилах; причем необязательно при концентрации IL-33 примерно EC56 антитело имеет IC50 75 нМ или менее, 50 нМ или менее либо 45 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело ингибирует стимулированное IL-33 высвобождение INF-γ из CD4+ Т-клеток; причем необязательно при концентрации IL-33 примерно EC34 антитело имеет IC50 75 нМ или менее, 50 нМ или менее либо 45 нМ или менее.

Фрагменты антител

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания может являться фрагментом антитела. Используемые фрагменты антител с детерминантами связывания настоящего описания включают, без ограничений, фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, одновалентные, имеющие один Fab-фрагмент антитела, фрагменты scFv и другие фрагменты, описанные в настоящем документе и известные специалистам в данной области. Обзор различных фрагментов антител см., например, в публикации Hudson et al., Nat. Med., 9: 129-134 (2003). Обзор фрагментов scFv см., например, в публикации Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); см. также WO93/16185; и патенты США №№ 5,571,894 и 5,587,458. Описание фрагментов Fab и F(ab')₂, содержащих остатки эпитопа связывания с рецептором реутилизации и имеющих увеличенный период полувыведения in vivo, см. в патенте США № 5,869,046. Другие формы одновалентных антител описаны, например, в WO2007/048037, WO2008/145137, WO2008/145138 и WO2007/059782. Одновалентные, имеющие один Fab-фрагмент антитела, описаны, например, в WO2005/063816. Диатела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть бивалентными или биспецифическими (см., например, EP0404097; WO93/01161; Hudson et al., Nat. Med., 9: 129-134 (2003); и Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)).

В некоторых вариантах осуществления фрагменты антител являются однодоменными антителами, которые содержат весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело является человеческим однодоменным антителом (Domantis, Inc., г. Уолтем, штат Массачусетс, США; см., например, патент США № 6,248,516).

Фрагменты антител могут быть получены различными способами, включая, без ограничений, протеолитическое переваривание интактного антитела, а также выработку рекомбинантными клетками-хозяевами (например, E. coli или фагом), как описано в настоящем документе.

Подразумевается, что любые антитела к IL1RAP настоящего описания могут быть получены в виде фрагментов антител с применением способов и методик, известных специалистам в данной области и/или

описанных в настоящем документе. Например, получение и анализ версий Fab-фрагментов различных антител к IL1RAP настоящего описания представлены в примере 8.

Химерные и гуманизированные антитела

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания может являться химерным антителом. (см., например, химерные антитела, описанные в патенте США № 4,816,567; и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). В одном варианте осуществления химерное антитело содержит переменную область, не принадлежащую человеку (например, переменную область, происходящую из молекулы мыши, крысы, хомяка, кролика или примата, отличного от человека, такого как низшие обезьяны), и человеческую константную область. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело является антителом «с переключенным классом», в котором класс или подкласс был изменен с того, к которому принадлежало исходное антитело. Подразумевается, что химерные антитела могут включать их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания является гуманизированным антителом. Как правило, нечеловеческое антитело гуманизируют для того, чтобы снизить иммуногенность для человека с сохранением при этом специфичности и аффинности исходного нечеловеческого антитела. По существу, гуманизированное антитело содержит один или более переменных доменов, в которых области CDR, например CDR (или их части), получены из нечеловеческого антитела, а области FR (или их части) получены из последовательностей человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно будет также содержать по меньшей мере часть человеческой константной области. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки в области FR в гуманизированном антителе замещены соответствующими остатками из нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого получены остатки области CDR) для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Обзор гуманизированных антител и способов их получения приведен, например, в публикации Almagro and Fransson, Front. Biosci, 13: 1619-1633 (2008), а дополнительное описание можно найти, например, в публикациях Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033 (1989); патентах США №№ 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321 и 7,087,409; Kashmiri et al., Methods, 36:25-34 (2005) (описание пересадки SDR (a-CDR)); Padlan, Mol. Immunol., 28:489-498 (1991) (описание «изменения поверхности»); Dall'Acqua et al., Methods, 36:43-60 (2005) (описание «перестановок FR»); и Osbourn et al., Methods, 36:61-68 (2005) и Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (описание подхода к перестановкам FR «направляемая селекция»).

Человеческие каркасные области, которые можно использовать для гуманизации, включают, без ограничений: каркасные области, выбранные с применением способа «наибольшего соответствия» (см., например, Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993)); каркасные области, полученные из консенсусных последовательностей человеческих антител из конкретной подгруппы переменных областей легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); и Presta et al., J. Immunol, 151:2623 (1993)); каркасные области зрелых человеческих антител (с соматическими

мутациями) или каркасные области человеческих антител зародышевой линии (см., например, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные при скрининге библиотек областей FR (см., например, Vasa et al., *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684 (1997) и Rosok et al., *J. Biol. Chem.*, 271:22611-22618 (1996)).

- 5 Подразумевается, что любые антитела к IL1RAP настоящего описания могут быть получены в виде гуманизированных антител с применением способов и методик, известных специалистам в данной области и/или описанных в настоящем документе. Например, получение и анализ гуманизированных версий антитела к IL1RAP настоящего описания представлены в разделе примеров.

Человеческие антитела

- 10 В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания может являться человеческим антителом. Человеческие антитела могут быть получены с применением различных способов, известных специалистам в данной области. Человеческие антитела в общем описаны в публикациях van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5: 368-74 (2001) и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.*, 20:450-459 (2008). Человеческие антитела могут быть получены путем введения иммуногена
- 15 трансгенному животному, которое было модифицировано таким образом для выработки интактных человеческих антител или интактных антител с человеческими переменными областями в ответ на антигенный стимул. Как правило, такие животные содержат все или часть локусов человеческих иммуноглобулинов, которые заменяют эндогенные локусы иммуноглобулинов или которые присутствуют вне хромосом или интегрируются случайным образом в хромосомы животного. У таких
- 20 трансгенных мышей эндогенные локусы иммуноглобулинов обычно инактивируются. Обзор способов получения человеческих антител из трансгенных животных см. в Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). См. также, например, технологию XENOMOUSE™ в патентах США №№ 6,075,181 и 6,150,584; технологию HUMAB® в патенте США № 5,770,429; технологию K-M MOUSE® в патенте США № 7,041,870; и технологию VELOCIMOUSE® в заявке на патент США № US 2007/0061900).
- 25 Человеческие переменные области из интактных антител, образованных такими животными, можно дополнительно модифицировать, например путем объединения с разными человеческими константными областями.

- Человеческие антитела также можно получать с помощью способов на основе гибридом. Описаны линии
- 30 клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши и человека для продуцирования моноклональных антител человека. См., например, Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86(1991). Человеческие антитела, полученные с применением гибридомной технологии с человеческими В-клетками, также описаны в публикации Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Дополнительные способы, описывающие получение человеческих моноклональных антител
- 35 IgM из линий гибридомных клеток, включают способы, описанные, например, в патенте США № 7,189,826. Технология с применением человеческих гибридом (т. е. технология Trioma) описана, например, в публикациях Vollmers et al., *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) и Vollmers et al., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-91 (2005).

Человеческие антитела также могут быть получены путем выделения клонированных последовательностей переменных доменов фрагментов Fv, выбранных из библиотек фагового дисплея, содержащих человеческие последовательности. Затем такие последовательности переменных доменов можно комбинировать с необходимым человеческим константным доменом. Способы выбора человеческих антител из библиотек антител описаны ниже.

Подразумевается, что любые из антител к IL1RAP настоящего описания могут быть получены в виде человеческих антител с применением способов и методик, известных специалистам в данной области и/или описанных в настоящем документе.

Антитела, полученные из библиотек

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания может быть выделено путем скрининга комбинаторных библиотек на антитела с требуемой активностью или активностями. Например, специалистам в данной области известны различные способы получения библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек на антитела, обладающие требуемыми характеристиками связывания. Применение фагового дисплея для получения вариантов гуманизированной версии антитела к IL1RAP с созревшей аффинностью настоящего описания представлено в примерах, описанных в настоящем документе. Другие способы получения таких антител из библиотек описаны, например, в публикациях Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology*, 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., *Antibody Phage Display*, Humana Press, Totowa, N.J., 2001); McCafferty et al., *Nature*, 348:552- 554; Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, *Methods in Molecular Biology*, 248: 161-175 (Lo, ed., *Antibody Engineering*, Humana Press, Totowa, N.J., 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.*, 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.*, 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (34): 12467-12472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Methods*, 284(1-2): 119-132(2004).

Подразумевается, что скрининг комбинаторной библиотеки можно применять для получения вариантов антител к IL1RAP настоящего описания с использованием способов и методик, известных специалистам в данной области и/или описанных в настоящем документе. Например, применение получения и скрининга библиотеки фагового дисплея для получения широкого спектра вариантов гуманизованного антитела к IL1RAP с созревшей аффинностью настоящего описания представлено в примере 1.

Мультиспецифические антитела

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания является мультиспецифическим антителом, например биспецифическим антителом. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело является моноклональным антителом, имеющим по меньшей мере два разных сайта связывания, каждый со специфичностью связывания к отличному антигену, по меньшей мере один из которых специфически связывается с IL1RAP. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из связывающих сайтов специфически связывается с цитотоксическим агентом. В примерах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания является биспецифическим антителом и может применяться для доставки цитотоксического агента к клеткам,

которые экспрессируют IL1RAP.

Способы получения мультиспецифических антител включают, без ограничений, рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелая цепь — легкая цепь иммуноглобулина, имеющих разные специфичности (см., например, WO2012131555).

- 5 Мультиспецифические антитела также могут быть получены генно-инженерными методами с помощью эффектов «управляемого электростатического взаимодействия», которые способствуют образованию молекул антитела с гетеродимерными Fc, а не гомодимерными (WO 2009/089004A1); поперечным сшиванием двух или более антител или фрагментов (см., например, патент США № 4,676,980 и Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); применением мотивов лейциновых молний для получения биспецифических
- 10 антител (см., например, Kostelny et al., *J. Immunol*, 148(5): 1547-1553 (1992)); применением способа с «диателами» для получения биспецифических фрагментов антител (см., например, Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); применением димеров одноцепочечных Fv (scFv) (см., например, Gruber et al., *J. Immunol*, 152:5368 (1994)); или триспецифических антител (см., например, Tutt et al., *J. Immunol.*, 147:60 (1991).
- 15 Подразумевается, что любое из антител к IL1RAP настоящего описания может быть получено в виде мультиспецифических антител с применением способов и методик, известных специалистам в данной области и/или описанных в настоящем документе.

Варианты антител

- В некоторых вариантах осуществления также рассматриваются варианты антитела к IL1RAP настоящего описания. Например, антитела с улучшенными аффинностью связывания и/или другими биологическими свойствами антитела могут быть получены путем внедрения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любая комбинация делеции, вставки и замены может быть выполнена так,
- 25 чтобы она попала в конечную конструкцию, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками связывания антигена IL1RAP. Подразумевается, что широкий спектр вариантов антител к IL1RAP настоящего описания может быть получен с применением способов и методик, известных специалистам в данной области и/или описанных в настоящем документе, включая, без ограничений: (i) варианты с аминокислотными заменами, вставками и/или делециями; (ii) варианты
- 30 гликозилирования; (iii) варианты области Fc; (iv) созданные генно-инженерными методами варианты с цистеином; и (v) производные варианты.

Варианты с заменами, вставками и делециями

- В некоторых вариантах осуществления предложены варианты антител к IL1RAP, имеющие одну или более аминокислотных замен в дополнение к описанным в настоящем документе. Сайты для мутагенеза
- 35 могут включать области CDR и FR. Специалистам в данной области хорошо известны типичные

«консервативные» аминокислотные замены и/или замены на основании принадлежности к одному классу боковых цепей или одинаковых свойств, и их можно применять в вариантах осуществления настоящего описания. В настоящем описании также предложены варианты, основанные на неконсервативных аминокислотных заменах, при которых член одного класса боковых цепей аминокислот заменяется на аминокислоту из другого класса.

Боковые цепи аминокислот, как правило, группируют в соответствии со следующими классами или общими свойствами: (1) гидрофобные: Met, Ala, Val, Leu, Ile, норлейцин; (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) кислые: Asp, Glu; (4) основные: His, Lys, Arg; (5) влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro; и (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

- 10 Специалистам в данной области хорошо известны способы внесения аминокислотной замены в антитело и последующего скрининга на требуемую функцию, например сохраненное/улучшенное связывание антигена, пониженную иммуногенность или улучшенные ADCC или CDC.

Варианты аминокислотных замен могут включать замену одного или более остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученный (-ые) вариант (-ы), отобранный (-ые) для дальнейшего исследования, будет (будут) характеризоваться модификациями определенных биологических свойств (например, повышенной аффинностью, пониженной иммуногенностью) по сравнению с исходным антителом и/или будет (будут) по существу сохранять определенные биологические свойства исходного антитела. Примером варианта с заменами является антитело с созревшей аффинностью, которое можно еще получить, например, с применением способа аффинного созревания, основанного на фаговом дисплее, такого как описанный в разделе примеров в этом документе. Вкратце, один или более остатков в области CDR подвергают мутагенезу, варианты антител экспонируют на поверхности фага и проводят скрининг на наличие определенной биологической активности (например, аффинности связывания).

Используемый способ идентификации остатков или областей антитела, которые могут служить мишенями для мутагенеза, называется «аланин-сканирующим мутагенезом» (см., например, Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085). В этом способе идентифицируют остаток или группу целевых остатков (например, такие заряженные остатки, как Arg, Asp, His, Lys и Glu) и замещают нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, Ala или полиаланином), чтобы определить, окажет ли это влияние на взаимодействие антитела с антигеном. Дополнительные замены могут быть внесены по положениям аминокислот, демонстрирующим функциональную чувствительность к первоначальным заменам. Альтернативно или дополнительно может быть определена кристаллическая структура комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактирующие остатки и соседние с ними остатки могут служить мишенью или могут быть исключены из кандидатов на замену. Можно провести скрининг вариантов для определения того, имеются ли у них требуемые свойства.

Вставки в аминокислотную последовательность включают слияние с amino- и/или карбокси-концами последовательностей, длина которых варьируется от одного остатка до полипептидов, содержащих сотни

или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метиониловым остатком. Другие варианты молекулы антитела со вставками включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом или полипептидом, который увеличивает период полувыведения антитела из сыворотки.

- 5 Замены могут быть проведены в областях CDR для улучшения аффинности антитела. Такие изменения могут быть осуществлены в «горячих точках», т. е. по остаткам, кодируемым кодонами, которые с высокой частотой претерпевают мутации во время процесса соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)), при этом полученный вариантный VH или VL испытывают на наличие аффинности связывания. В одном из вариантов осуществления созревание аффинности может быть осуществлено путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек (см., например, Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology*, 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., *Antibody Phage Display*, Humana Press, Totowa, N.J., (2001))). Еще один способ внесения разнообразия включает способы, направленные на области CDR, в которых несколько остатков в области CDR (например, 4–6 остатков за один раз) заменяют случайным образом. Можно специфически идентифицировать остатки в области CDR, вовлеченные в связывание антигена, например, применяя аланин-сканирующий мутагенез или моделирование. Частыми мишенями являются, в частности, CDR-H3 и CDR-L3.

- В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции могут происходить внутри одной или более областей CDR, при условии, что такие изменения по существу не снижают способность антитела связываться с антигеном. Например, в областях CDR могут быть проведены консервативные изменения (например, консервативные замены, предложенные в настоящем документе), которые по существу не снижают аффинность связывания. Такие изменения могут находиться вне пределов «горячих точек» областей CDR. В некоторых вариантах осуществления вариантных последовательностей VH и VL, приведенных выше, каждая область CDR либо не изменена, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Варианты гликозилирования

- В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания изменено для повышения или понижения степени гликозилирования антитела. Добавление или делеция сайтов гликозилирования в антителе могут быть выполнены путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы создать или удалить один или более сайтов гликозилирования.

- В вариантах осуществления, в которых антитело содержит область Fc, можно изменить углевод, присоединенный к области Fc. Как правило, нативные антитела, вырабатываемые клетками млекопитающих, содержат разветвленный двухантенарный олигосахарид, присоединенный N-гликозидной связью к Asn297 в домене CH2 области Fc (см., например, Wright et al., *TIBTECH*, 15:26-32 (1997)). Олигосахарид может содержать различные углеводы, такие как манноза, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактоза и сиаловая кислота, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в «стволе» структуры двухантенарного олигосахарид. В некоторых вариантах осуществления с помощью модификаций

олигосахарида в области Fc антитела можно создать вариант с определенными улучшенными свойствами.

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания может являться вариантом исходного антитела, содержащим углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (напрямую или опосредованно) к области Fc. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от примерно 1% до примерно 80%, от примерно 1% до примерно 65%, от примерно 5% до примерно 65% или от примерно 20% до примерно 40%. Количество фукозы может быть определено путем вычисления среднего количества фукозы в цепочке сахара, присоединенной к остатку Asn297, относительно суммарного содержания всех гликоструктур, присоединенных к остатку Asn297 (например, сложных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), измеренного с помощью масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным анализом (MALDI-TOF) (см., например, WO 2008/077546). Asn297 означает остаток аспарагина, расположенный примерно в положении 297 области Fc (система нумерации EU для остатков в области Fc); однако Asn297 может также располагаться в положении примерно на ± 3 аминокислоты ближе к N-концу или ближе к C-концу относительно положения 297, т. е. между положениями 294 и 300, из-за минорных вариаций последовательности в антителах.

В некоторых вариантах осуществления варианты фукозилирования могут иметь улучшенную функцию ADCC. См., например, патентные публикации США №№ US 2003/0157108 или US 2004/0093621. Примеры «дефукозилированных» или «фукозодефицитных» антител и ассоциированных способов их получения описаны, например, в US2003/0157108; US2003/0115614; US2002/0164328; US2004/0093621; US2004/0132140; US2004/0110704; US2004/0110282; US2004/0109865; WO2000/61739; WO2001/29246; WO2003/085119; WO2003/084570; WO2005/035586; WO2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al., *J. Mol. Biol.*, 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004).

Клеточные линии, которые можно использовать для получения дефукозилированных антител, включают клетки Led 3 CHO, дефицитные по фукозилированию белков (см., например, Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 249:533-545 (1986); US2003/0157108 и WO2004/056312), и нокаутные клеточные линии, такие как клетки CHO, нокаутные по гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); и WO2003/085107).

Варианты области Fc

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания может содержать одну или более аминокислотных модификаций в области Fc (т. е. вариант области Fc). Вариант области Fc может содержать последовательность человеческой области Fc (например, области Fc человеческих IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую аминокислотную замену в одном или более положениях аминокислотных остатков. Ниже описан известный специалистам в данной области широкий диапазон вариантов области Fc, которые можно использовать с антителами к IL1RAP настоящего описания.

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP является антителом с вариантом области Fc,

который имеет измененную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления антитело с измененной эффекторной функцией демонстрирует некоторые (но не все) эффекторные функции, пониженную эффекторную функцию или не демонстрирует эффекторных функций (например, безэфекторное антитело) исходного антитела. Безэфекторные варианты области Fc более желательны для определенных применений, когда эффекторная функция (например, ADCC) не является необходимой или является вредной, и/или важным является период полувыведения антитела *in vivo*.

Антитела с вариантами области Fc с пониженной эффекторной функцией или являющиеся безэфекторными могут содержать аминокислотную замену по одному или более из следующих положений в области Fc: 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (см., например, патент США № 6,737,056).

Такие варианты области Fc могут содержать аминокислотные замены по двум или более из положений 265, 269, 270, 297 и 327. Такие варианты области Fc могут также содержать замены обоих остатков 265 и 297 на аланин (см., например, патент США № 7,332,581). Как описано в примерах и других местах в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления антитела к IL1RAP настоящего описания являются антителами с безэфекторными вариантами области Fc. В некоторых вариантах осуществления безэфекторные варианты области Fc антител к IL1RAP содержат аминокислотную замену N297G.

Варианты области Fc, обладающие улучшенным или пониженным связыванием с FcR, описаны, например, в патенте США № 6,737,056; WO 2004/056312; и Shields et al., J. Biol. Chem., 276(9): 6591-6604 (2001). Варианты области Fc, имеющие улучшенную ADCC, могут содержать одну или более аминокислотных замен, например а положениях 298, 333 и/или 334 области Fc (согласно системе нумерации EU). Варианты области Fc, обладающие измененными (т. е. либо улучшенными, либо уменьшенными) связыванием с Clq и/или комплемент-зависимой цитотоксичностью (CDC), описаны, например, в патенте США № 6,194,551, WO99/51642 и Idusogie et al., J. Immunol., 164: 4178-4184 (2000). Варианты области Fc с увеличенными периодами полувыведения и улучшенным связыванием с неонатальным рецептором Fc (FcRn) описаны, например, в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Такие варианты области Fc содержат аминокислотные замены в одном или более положениях: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 и 434. Другие варианты области Fc с увеличенными периодами полувыведения содержат набор мутаций YTE в положениях 252, 254 и 256 (т. е. M252Y/S254T/T256E), описанный, например, в патенте США № 7,658,921 B2 (Dall'Acqua et al.). Как описано в примерах и других местах в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления антитела к IL1RAP настоящего описания являются антителами с вариантами области Fc, которые содержат набор мутаций YTE. Другие примеры вариантов области Fc см., например, в патентах США №№ 5,648,260 и 5,624,821; и WO94/29351.

Как отмечено в других местах в настоящем документе, область Fc антитела природного происхождения, как правило, содержит С-концевой лизин в положении 447 (Lys447). Однако этот С-концевой лизин часто отщепляется от области Fc во время выработки рекомбинантных антител в клеточной культуре в результате ферментативного расщепления (например, при выработке в клетках CHO). Соответственно, подразумевается, что любые из антител к IL1RAP, описанных в настоящем документе как содержащие

область Fc с С-концевым лизином, также включают идентичное антитело к IL1RAP, содержащее область Fc, за исключением того, что в нем отсутствует С-концевой лизин. Аналогично подразумевается, что любые из антител к IL1RAP, описанных в настоящем документе как содержащие область Fc без С-концевого лизина, также включают идентичное антитело к IL1RAP, содержащее область Fc, за исключением того, что в нем присутствует С-концевой лизин.

По существу, для подтверждения снижения/истощения активностей CDC и/или ADCC у варианта области Fc можно проводить анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo*. Например, можно проводить анализы связывания с рецепторами Fc (FcR), чтобы убедиться в том, что у антитела отсутствует способность связываться с FcγR (следовательно, вероятно, отсутствует активность ADCC), но сохраняется способность связываться с FcRn. Основные клетки, опосредующие ADCC (NK-клетки), экспрессируют только FcγRIII, а моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Не имеющие ограничительного характера примеры анализов *in vitro* для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5,500,362 (см., например, Hellstrom, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 82: 1499-1502 (1985); патенте США № 5,821,337 (см. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med., 166:1351-1361 (1987)). Альтернативно можно применять способы анализа без радиоактивной метки (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТТ™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc., г. Маунтин-Вью, штат Калифорния, США) и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox96® (Promega, г. Мадисон, штат Висконсин, США). Подходящие для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и натуральные киллерные (NK) клетки. Альтернативно или дополнительно активность ADCC представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как описанная в публикации Clynes et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 95:652-656 (1998). Можно также проводить анализы связывания с Clq, чтобы подтвердить, что антитело неспособно связываться с Clq и, следовательно, не обладает активностью CDC. См., например, ИФА для оценки связывания с Clq и C3c в WO2006/029879 и WO2005/100402. Для оценки активации системы комплемента может быть выполнен анализ CDC (см., например, в Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202: 163 (1997), Cragg, M. S. et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); и Cragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood, 103:2738-2743 (2004)). Определения связывания с FcRn и клиренса/периода полувыведения *in vivo* можно проводить с применением способов, известных специалистам в данной области (см., например, Petkova, et al., Int. Immunol., 18(12): 1759-1769 (2006)).

Созданные генно-инженерными методами варианты с цистеином

В некоторых вариантах осуществления предполагается, что в антителе к IL1RAP, описанном в настоящем документе, остатки в специфических положениях, находящихся не в областях CDR, могут быть замещены на остатки цистеина для создания реакционноспособных тиоловых групп. Такие созданные генно-инженерными методами тио-моноклональные антитела («тиоМАт») можно применять для конъюгирования антитела, например, с фрагментами лекарственных препаратов или комплексами линкер-фрагмент лекарственного препарата, при этом создаются иммуноконъюгаты, такие как описанные в других местах в настоящем документе. Созданные генно-инженерными методами антитела с цистеином

могут быть получены, как описано, например, в патенте США № 7,521,541. В некоторых вариантах осуществления любой один или более из следующих остатков в антителе могут быть замещены на цистеин: V205 (нумерации по Кабату) в легкой цепи; A118 (нумерация EU) в тяжелой цепи и S400 (нумерация EU) в области Fc тяжелой цепи.

5 Производные варианты

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания можно дополнительно модифицировать (т. е. получить производные) небелковыми фрагментами. Небелковые фрагменты, пригодные для получения производных антитела, включают, без ограничений, водорастворимые полимеры, такие как полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислотные гомополимеры или случайные сополимеры и декстран или поли(п-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры полипропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. В некоторых вариантах осуществления модификацию антитела можно выполнять с применением пропиональдегида метоксиполиэтиленгликоля. Полимеры могут иметь любую молекулярную массу и могут быть разветвленными или неразветвленными. Число полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться, и при присоединении более одного полимера они могут быть одинаковыми или различными молекулами. В целом число и/или тип полимеров, используемых для получения производных, можно определить на основании ряда факторов, включая, без ограничений, конкретные свойства или функции антитела, например, будет ли производное антитела использоваться в терапии в заданных условиях.

Иммуноконъюгаты

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания может также являться иммуноконъюгатом, содержащим антитело к IL1RAP, конъюгированное с одним или более цитотоксическими агентами. Подходящие цитотоксические агенты, предложенные в настоящем описании, включают химиотерапевтические агенты, лекарственные средства, ингибирующие рост агенты, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат является конъюгатом антитела с лекарственным средством (ADC), в котором антитело к IL1RAP, как описано в настоящем документе, конъюгировано с одним или более лекарственными средствами.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат настоящего описания содержит антитело к IL1RAP, как описано в настоящем документе, конъюгированное с лекарственным средством или терапевтическим агентом для лечения заболевания или состояния, опосредованного IL-1, IL-33, IL-36 и/или IL1RAP.

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP, как описано в настоящем документе, может быть конъюгировано с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, без ограничений, А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модексина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana*, ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат настоящего описания содержит антитело к IL1RAP, как описано в настоящем документе, конъюгированное с радиоактивным изотопом (т. е. является радиоаконъюгатом). Для получения таких радиоаконъюгатов доступны разнообразные радиоактивные изотопы. Примеры включают ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb и радиоактивные изотопы Lu. В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат может содержать радиоизотоп для сцинтиграфической детекции или спиновую метку для ЯМР-детекции или МРТ. Пригодные радиоизотопы или спиновые метки могут включать ^{123}I , ^{131}I , ^{111}n , ^{13}O , ^{19}F , ^{15}N , ^{17}O , различные изотопы Gd, Mn и Fe.

Имуноконъюгаты антитела к IL1RAP и цитотоксического агента могут быть получены с применением различных хорошо известных бифункциональных реагентов и химических соединений для конъюгации с белками. Такие реагенты включают, без ограничений: N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (например, диметиладипимидат HQ), активные сложные эфиры (например, дисукцинимидилсуберат), альдегиды (например, глутаральдегид), бис-азидные соединения (например, бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (например, бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (например, толуол-2,6-диизоцианат) и соединения с двумя активными фтор-группами (например, 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

Реагенты для получения иммуноконъюгатов настоящего описания могут также включать доступные в продаже «поперечно-сшивающие» реагенты, такие как: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, сульфо-SMPB и сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат (SVSB) (например, см. Pierce Biotechnology, Inc., г. Рокфорд, штат Иллинойс, США).

30 Синтетические антитела

В некоторых вариантах осуществления антитело к IL1RAP настоящего описания может являться синтетическим антителом, содержащим набор областей CDR из иммуноглобулина к IL1RAP (например, CDR-L1 и т. д.), привитых в каркас, отличный от каркаса иммуноглобулина, например, каркас альтернативного белка или искусственный полимерный каркас.

35 Примеры каркасов альтернативных белков, предлагаемых для получения синтетических антител настоящего описания, могут включать, без ограничений, фибронектин, неокарциностагин CBM4-2,

липокалина, T-клеточный рецептор, домен белка A (белок Z), Im9, TPR-белки, домены «цинковых пальцев», pVIII, птичий панкреатический полипептид, GCN4, WW-домен, гомологичный Src домен 3, PDZ-домены, TEM-1 бета-лактамазу, тиоредоксин, стафилококковую нуклеазу, домены «PHD-пальцев», CL-2, BPTI, APPI, HPSTI, екотин, LACI-D1, EDTI, МТИ-II, токсины скорпионов, пептид дефенсина A насекомых, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, цитохром b-562, домены Ld1-рецептора, гамма-кристаллин, убиквитин, трансферрин и/или домены, подобные лектинам C-типа.

Примеры искусственных полимерных (небелковых) каркасов, используемых для получения синтетических антител, описаны, например, в публикациях Fiedler et al., (2014) Non-Antibody Scaffolds as Alternative Therapeutic Agents, Handbook of Therapeutic Antibodies (eds. S. DObel and J. M. Reichert), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.; Gebauer et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 13:245-255 (2009); Binz et al., Nat. Biotech., 23(10): 1257-1268 (2005).

Рекомбинантные способы и композиции

Антитело к IL1RAP настоящего описания может быть получено с применением рекомбинантных способов и материалов, хорошо известных специалистам в области получения антител. В некоторых вариантах осуществления настоящее описание относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело к IL1RAP. Нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH, из состава антитела (например, легкая и/или тяжелая цепи антитела). В некоторых вариантах осуществления предложены один или более векторов (например, экспрессионных векторов), содержащих последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антитело к IL1RAP настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антитело к IL1RAP настоящего описания. В одном из вариантов осуществления клетка-хозяин была трансформирована вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В другом варианте осуществления клетка-хозяин была трансформирована первым вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и вторым вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантных способов применяемая клетка-хозяин является эукариотической клеткой, такой как клетка яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидная клетка (например, YO, NSO, Sp20). В одном из вариантов осуществления предложен способ получения антитела к IL1RAP, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как описано выше, в условиях, пригодных для экспрессии антитела, и необязательно извлечение антитела из клетки-хозяина (или культуральной питательной среды клетки-хозяина).

Вкратце, рекомбинантное получение антитела к IL1RAP осуществляют путем выделения нуклеиновой

кислоты, кодирующей антитело (например, как описано выше), и вставки этой нуклеиновой кислоты в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такие нуклеиновые кислоты можно легко выделить и секвенировать с помощью стандартных процедур, хорошо известных специалистам в данной области (например, с помощью олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи необходимого антитела). Подходящие клетки-хозяева и способы культивирования для клонирования или экспрессии кодирующих антитело векторов хорошо известны специалистам в данной области и включают прокариотические и эукариотические клетки. Как правило, после экспрессии антитело можно выделить из клеточной массы в виде растворимой фракции и подвергнуть дальнейшей очистке. Помимо прокариотов эукариотические микроорганизмы, такие как грибомицеты или дрожжи, являются подходящими организмами-хозяевами для клонирования или экспрессии кодирующих антитела векторов, включая штаммы грибов и дрожжей, у которых пути гликозилирования были «гуманизированы», в результате чего можно обеспечить антитело, у которого характер гликозилирования частично или полностью соответствует гликозилированию у человека (см., например, Gerngross, *Nat. Biotech.*, 22: 1409-1414 (2004) и Li et al., *Nat. Biotech.*, 24:210-215 (2006)).

Приемлемые клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных антител к IL1RAP настоящего описания также могут быть получены из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают в себя клетки растений и насекомых. Были идентифицированы различные штаммы бакуловирусов, которые можно применять вместе с клетками насекомых, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. В качестве клеток-хозяев также можно применять культуры клеток растений (см., например, патенты США №№ 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548 и 7,125,978).

Примеры линий клеток-хозяев млекопитающих, используемых для получения антител к IL1RAP настоящего описания, включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), в том числе клетки DHFR-CHO (см., например, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); линии клеток миеломы, такие как YO, NSO и Sp2/0; линию клеток почки обезьяны CVI, трансформированную SV40 (COS-7); линию клеток почки эмбриона человека (293 или клетки 293, описанные, например, в публикации Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомячка (BHK); мышинные клетки Сертоли (клетки TM4, описанные, например, в публикации Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CVI); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени крыс линии Buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мышей (MMT 060562); клетки TRI (см., например, Mather et al., *Annals N Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5 и клетки FS4. Общий обзор используемых линий клеток-хозяев млекопитающих, приемлемых для получения антител, см., например, в Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., *Antibody Engineering*, Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).

Фармацевтические композиции и составы антител к IL1RAP

Настоящее описание также относится к фармацевтическим композициям и фармацевтическим составам, содержащим антитело к IL1RAP. В некоторых вариантах осуществления настоящего описания

предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело к IL1RAP, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Такие фармацевтические составы могут быть получены путем смешивания антитела к IL1RAP, имеющего необходимую степень чистоты, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. Как правило, такие составы антител могут быть
5 получены в виде водного раствора (см., например, патент США № 6,171,586 и WO2006/044908) или в виде лиофилизированного состава (см., например, патент США № 6,267,958).

Кроме того, предполагается, что композиции и составы, содержащие антитело к IL1RAP, такое как описанное в настоящем документе, могут дополнительно содержать другие активные ингредиенты (т. е. терапевтические агенты), помимо антитела к IL1RAP, используемые для определенного показания, в
10 контексте лечения субъекта, которому вводят состав. Предпочтительно любой дополнительный терапевтический агент обладает активностью, комплементарной активности антитела к IL1RAP, и эти активности не оказывают друг на друга нежелательного воздействия. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления описание относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело к IL1RAP, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель, которая
15 дополнительно содержит терапевтический агент, используемый для лечения заболевания или состояния, опосредованного IL-1, IL-33, IL-36 и/или IL1RAP. В некоторых вариантах осуществления, например когда показание является онкологическим заболеванием, терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический препарат, подходящий для конкретного типа онкологического заболевания. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент в композиции является
20 антагонистом сигнального пути IL-1, IL-33, IL-36.

Фармацевтически приемлемые носители по существу нетоксичны для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях. Специалистам в данной области хорошо известен широкий диапазон таких фармацевтически приемлемых носителей (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). Примеры фармацевтически приемлемых носителей, используемых в составах
25 настоящего описания, могут включать, без ограничений: буферы, например на основе фосфата, цитрата и других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); полипептиды низкой
30 молекулярной массы (менее примерно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий;
35 металлокомплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

Фармацевтически приемлемые носители, используемые в составах настоящего описания, могут также включать агенты диспергирования лекарственных средств в межклеточном пространстве, такие как

растворимые гликопротеины гиалуронидазы, активной в нейтральной среде (sHASEGP) (см., например, публикации патентов США № 2005/0260186 и 2006/0104968), такие как человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20 (например, rHuPH20 или HYLENEX®, Baxter International, Inc.).

5 Дополнительные терапевтические агенты и активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, с помощью коацервации или с помощью полимеризации на границе фаз, например, заключены в гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли-(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственного средства (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

15 В некоторых вариантах осуществления состав может являться препаратом антитела и/или других активных ингредиентов с замедленным высвобождением. Приемлемые примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем матрицы находятся в форме формованных изделий, например пленок или микрокапсул.

Как правило, составы настоящего описания для введения субъекту являются стерильными. Стерильные составы могут быть легко получены с применением хорошо известных методик, например путем фильтрации через мембраны для стерилизующей фильтрации.

Применения и способы лечения

20 Предполагается, что любую композицию или состав, содержащие антитело к IL1RAP настоящего описания, можно применять для любых способов или применений, таких как способы лечения, в которых используется их способность специфически связываться с IL1RAP и/или блокировать активность IL1RAP, в частности блокировать способность IL1RAP опосредовать внутриклеточную передачу сигналов от цитокинов семейства IL-1 — IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ . Внутриклеточные
25 сигнальные пути, опосредуемые IL1RAP, включают пути IL-1, IL-33 и IL-36 и, в частности, включают по меньшей мере сигнальные пути, стимулируемые цитокиновыми агонистами IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ . Ингибирование IL1RAP-опосредованных сигнальных путей можно проанализировать *in vitro*, применяя известные клеточные анализы блокировки, включая репортерный клеточный анализ и клеточный анализ блокировки с первичными клетками, описанные в разделе
30 примеров настоящего описания.

IL1RAP-опосредованное заболевание может включать любое заболевание или состояние, ассоциированное с повышенными в физиологических жидкостях или тканях уровнями цитокинов семейства IL-1, по отношению к которым IL1RAP выступает в качестве корцептора при опосредовании передачи сигнала: IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ . Повышенные уровни IL-1 α , IL-1 β , IL-
35 33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ могут включать, например, уровни, которые превышают уровни, обнаруживаемые в конкретной клетке или ткани в норме, или могут являться любым поддающимся

определению уровнем в клетке или ткани, которая в норме не экспрессирует эти цитокины.

Как правило, IL1RAP-опосредованные состояния или заболевания имеют следующие характеристики: (1) патологии, ассоциированные с состоянием или заболеванием, могут быть экспериментально индуцированы у животных путем введения IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ и/или путем активации экспрессии IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ ; и (2) патологии, ассоциированные с состоянием или заболеванием в экспериментальных животных моделях, можно подавить агентами, обладающими известной способностью ингибировать действие IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ .

Известно, что IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ являются провоспалительными цитокинами, однако известно, что аномальное функционирование сигнальных путей IL-1, IL-33 и/или IL-36, стимулируемых этими цитокинами, при посредничестве IL1RAP в качестве корцептора, ассоциировано с широким спектром заболеваний и состояний, обычно включающих, без ограничений, воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, респираторные заболевания, нарушения обмена веществ, инфекции и онкологические заболевания.

Например, широкий спектр состояний и заболеваний, ассоциированных с аномальным функционированием передачи сигнала от IL-33 и, следовательно, также опосредуемых корцепторной активностью IL1RAP, включает, без ограничений, следующее: опосредованное расстройство может являться воспалительным состоянием (таким как астма, гиперреактивность дыхательных путей, воспаление дыхательных путей, сепсис, септический шок, атопический дерматит, аллергический ринит, ревматоидный артрит или хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)); иммунным расстройством (таким как астма, ревматоидный артрит, аллергия, атопическая аллергия, анафилаксия, анафилактический шок, аллергический ринит, псориаз, системный склероз, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, сахарный диабет или заболевание печени); фиброзирующим заболеванием (таким как идиопатический легочный фиброз (IPF)); эозинофильным расстройством (таким как эозинофильное заболевание желудочно-кишечного тракта, такое как эозинофильный эзофагит); инфекцией (такой как гельминтная инвазия, протозойная, такая как инфекция *Leishmania major*, или вирусная инфекция, такая как инфекция респираторно-синцитиального вируса (RSV) или грипп); болью (такой как воспалительная боль); расстройством центральной нервной системы (таким как болезнь Альцгеймера); солидной опухолью (такой как опухоль молочной железы, опухоль толстой кишки, опухоль предстательной железы, опухоль легкого, опухоль почки, опухоль печени, опухоль предстательной железы, опухоль желудка, опухоль кишечника, опухоль головного мозга, опухоль кости или опухоль кожи); или офтальмологическим расстройством. Специфические офтальмологические расстройства, опосредованные IL-33, могут включать, без ограничений, возрастную макулярную дегенерацию (AMD), включая влажную AMD, сухую AMD, промежуточную AMD, прогрессирующую AMD и географическую атрофию (GA)), ретинопатию (например, диабетическую ретинопатию (DR), ретинопатию недоношенных (ROP) и высокогорную DR), полипloidную хориоидальную васкулопатию (PCV), диабетический макулярный отек, синдром сухого глаза, болезнь Бехчета, отслойку сетчатки, глаукому, увеит (например, инфекционный и неинфекционный увеит), пигментный ретинит, врожденный амавроз Лебера, болезнь

Штаргардта, травматическое повреждение глаза и конъюнктивит (например, инфекционный конъюнктивит, неинфекционный конъюнктивит и аллергический конъюнктивит).

Аналогично, широкий спектр состояний и заболеваний, ассоциированных с аномальным функционированием передачи сигнала от IL-1 и, следовательно, также опосредуемых корцепторной активностью IL1RAP, включает без ограничений: острый панкреатит; боковой амиотрофический склероз (БАС); болезнь Альцгеймера; кахексию/анорексию, включая кахексию, индуцированную СПИД; астму и другие заболевания легких; атеросклероз; аутоиммунный васкулит; синдром хронической усталости; заболевания, ассоциированные с клостридиями, включая диарею, вызванную клостридиями; состояния и показания, связанные с коронарными сосудами, включая застойную сердечную недостаточность, рестеноз коронарных сосудов, инфаркт миокарда, нарушение функции миокарда (например, связанное с сепсисом) и аортокоронарное шунтирование сердца; онкологическое заболевание, такое как множественная миелома и миелогенные лейкомии (например, ОМЛ или ХМЛ) и другие типы лейкомии, а также метастазы опухоли; сахарный диабет (например, инсулинозависимый сахарный диабет); эндометриоз; лихорадку, фибромиалгию; гломерулонефрит; реакцию «трансплантат против хозяина» / отторжение трансплантата; геморрагический шок; гипералгезию; воспалительное заболевание кишечника; воспалительные состояния сустава, включая остеоартрит, псориатический артрит и ревматоидный артрит; воспалительное заболевание глаза, которое может быть ассоциировано, например, с трансплантацией роговицы; ишемию, включая церебральную ишемию (например, повреждение головного мозга в результате травмы, эпилепсии, кровотечения или инсульта, каждое из которых может приводить к нейродегенерации); болезнь Кавасаки; снижение способности к обучению; заболевание легких (например, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС)); рассеянный склероз; миопатии (например, нарушение белкового метаболизма в мышцах, особенно при сепсисе); нейротоксичность (например, индуцированная ВИЧ); остеопороз; боль, включая боль, вызванную онкологическим заболеванием; болезнь Паркинсона; заболевание пародонта; преждевременные роды; псориаз; реперфузионное повреждение; септический шок; побочные эффекты лучевой терапии; заболевание височно-нижнечелюстного сустава; нарушение сна; увеит; или воспалительные состояния, вызванные напряжением, растяжением, повреждением хряща, травмой, ортопедическим хирургическим вмешательством, инфекцией или другими патологическими процессами.

Проводится клиническая разработка агентов, действующих в качестве антагонистов или ингибиторов сигнальных путей IL-1, IL-33 и/или IL-36, для лечения целого ряда заболеваний и состояний, включая, без ограничений, акне, острый тяжелый язвенный колит, болезнь Стилла взрослых, аллергический ринит, системный склероз, артрит (включая подагрический, ювенильный, ревматоидный артрит и остеоартрит), боль при артрите, астму, атеросклероз, атопическую экзему, болезнь Бехчета, кахексию, рак (включая рак молочной железы, колоректальный рак, немелкоклеточный рак легких и рак поджелудочной железы), хроническую обструктивную болезнь легких, синдром сухого глаза, семейный холодовой аутовоспалительный синдром, семейную средиземноморскую лихорадку, пищевую аллергию, генерализованный пустулезный псориаз, гнойный гидраденит, синдром гипериммуноглобулинемии D, гиперурикемию, синдром Макла — Уэллса, мультисистемное воспалительное заболевание неонатального возраста, скелетно-мышечную боль, ладонно-подошвенный пустулез, заболевание периферических

сосудов, ревматическую полимиалгию, полип носа, псориаз, гангренозную пиодермию, рестеноз, серповидно-клеточную анемию, синусит, периодический синдром, ассоциированный с мутацией гена рецептора TNF, сахарный диабет 2-го типа и язвенный колит.

5 Предполагается, что любую из композиций или составов, содержащую антитело к IL1RAP настоящего описания, можно применять в способах или применять для лечения любых из вышеперечисленных заболеваний или состояний, ассоциированных с аномальным функционированием сигнального пути, индуцируемого IL-1, IL-33 и/или IL-36 и, следовательно, опосредуемого корцепторной активностью IL1RAP. Как правило, эти состояния и заболевания включают, без ограничений, воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, респираторные заболевания, нарушения обмена веществ, инфекции и онкологические заболевания.

10 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиции или составы, содержащие антитело к IL1RAP настоящего описания, можно применять в способе, лечении, лекарственном средстве, для диагностики или применять для применения в лечении состояния или заболевания, выбранных из акне, острого панкреатита, острого тяжелого язвенного колита, болезни Стилла взрослых, возрастной макулярной дегенерации (AMD), гиперреактивности дыхательных путей, воспаления дыхательных путей, 15 аллергического конъюнктивита, аллергического ринита, аллергии, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (БАС), анафилаксии, боли при артрите, астмы, атеросклероза, атопического дерматита, атопической экземы, аутоиммунных васкулитов, болезни Бехчета, рака костей, рака головного мозга, рака молочной железы, кахексии/анорексии, воспаления хряща, церебральной ишемии, синдрома хронической усталости, хронической обструктивной болезни легких, заболеваний, ассоциированных с 20 клостридиями, колоректального рака, застойной сердечной недостаточности, конъюнктивита, аортокоронарного шунтирования сердца, рестеноза коронарных сосудов, болезни Крона, сахарного диабета, диабетического макулярного отека, диабетической ретинопатии, синдрома сухого глаза, эндометриоза, эозинофильного заболевания желудочно-кишечного тракта, эозинофильного эзофагита, 25 семейного холодового аутовоспалительного синдрома, семейной средиземноморской лихорадки, лихорадки, фибромиалгии, фиброзирующего заболевания, пищевой аллергии, генерализованного пустулезного псориаза, глаукомы, гломерулонефрита, подагрического артрита, реакции «трансплантат против хозяина», гельминтной инвазии, геморрагического шока, гнойного гидраденита, гипералгезии, синдрома гипериммуноглобулинемии D, гиперурикемии, идиопатического легочного фиброза (IPF), 30 боли, вызванной онкологическим заболеванием, инфекции, воспалительного заболевания кишечника (IBD), воспалительных состояний, вызванных напряжением, воспалительного заболевания глаза, ассоциированного с трансплантацией роговицы, воспалительной боли, гриппа, рака кишечника, ишемии, ювенильного артрита, болезни Кавасаки, рака почки, врожденного амавроза Лебера, рака печени, заболевания печени, рака легких, синдрома Макла — Уэллса, множественной миеломы, рассеянного 35 склероза, скелетно-мышечной боли, миелогенной лейкемии и лейкемии других типов, нарушения функции миокарда, миопатий, полипа носа, мультисистемного воспалительного заболевания неонатального возраста, нейротоксичности, неинфекционного конъюнктивита, немелкоклеточного рака легких, ортопедического хирургического вмешательства, остеоартрита, остеопороза, боли, ладонно-подошвенного пустулеза, рака поджелудочной железы, болезни Паркинсона, заболевания пародонта,

заболевания периферических сосудов, ревматической полимиалгии, полипoidalной хориоидальной васкулопатии (PCV), преждевременных родов, рака предстательной железы, протозойной инфекции, псориаза, псориазического артрита, гангренозной пиодермии, реперфузионного повреждения, респираторно-синцитиального вируса (RSV), рестеноза, отслойки сетчатки, пигментозного ретинита, 5 ретинопатии недоношенных (ROP), ревматоидного артрита, септического шока, серповидно-клеточной анемии, побочных эффектов лучевой терапии, синусита, рака кожи, нарушения сна, растяжения, болезни Штаргардта, рака желудка, заболевания височно-нижнечелюстного сустава, периодического синдрома, ассоциированного с мутацией гена рецептора TNF, отторжения трансплантата, травмы, травматического повреждения глаза, сахарного диабета 2-го типа, язвенного колита и увеита.

10 Как описано в настоящем документе, включая примеры ниже, антитела к IL1RAP настоящего описания способны снижать, ингибировать и/или блокировать внутриклеточную передачу сигнала через IL1RAP-опосредуемые пути, включая сигнальные пути IL-1, IL-33 и/или IL-36. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящее описание относится к способу лечения IL1RAP-опосредованного 15 заболевания или состояния у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к IL1RAP настоящего описания или введение субъекту, которому это необходимо, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело к IL1RAP настоящего описания и фармацевтически приемлемый носитель.

20 Как описано в других местах в настоящем документе, антитела к IL1RAP настоящего описания способны снижать, ингибировать и/или блокировать сигнальные пути IL-1, IL-33 и IL-36. Соответственно, настоящее описание также относится к способам лечения заболеваний и состояний, отвечающих на снижение, ингибирование и/или блокировку сигнальных путей IL-1, IL-33 и/или IL-36.

25 Кроме того, антитела к IL1RAP настоящего описания способны снижать, ингибировать и/или блокировать внутриклеточную передачу сигнала, стимулируемую агонистами IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ . Соответственно, настоящее описание также относится к способам лечения заболеваний и состояний, отвечающих на снижение, ингибирование и/или блокировку внутриклеточной передачи 30 сигнала, стимуливаемой агонистами IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ .

30 Была установлена ассоциация сигнальных путей IL-1, которые также являются IL1RAP-опосредованными путями, со многими формами онкологических заболеваний. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящее описание относится к способу лечения онкологического заболевания у субъекта, включающему введение субъекту, которому это необходимо, терапевтически эффективного 35 количества антитела к IL1RAP настоящего описания или введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело к IL1RAP настоящего описания и фармацевтически приемлемый носитель.

35 Была установлена ассоциация всех трех сигнальных путей IL-1, IL-33 и/или IL-36 которые также являются IL1RAP-опосредованными путями, с астмой. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящее описание относится к способу лечения астмы у субъекта, включающему введение субъекту, которому это необходимо, терапевтически эффективного количества антитела к IL1RAP настоящего

описания или введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело к IL1RAP настоящего описания и фармацевтически приемлемый носитель.

5 В некоторых вариантах осуществления настоящее описание относится к способу лечения и/или предотвращения IL1RAP-опосредованного заболевания, заболевания, опосредованного сигнальными путями IL-1, IL-33 и IL-36, и/или заболевания, опосредованного внутриклеточной передачей сигнала, стимулируемой агонистами IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36 α , IL-36 β и/или IL-36 γ . В таком способе вариантов осуществления лечения способ включает введение субъекту, которому это необходимо, терапевтически эффективного количества антитела к IL1RAP или композиции или фармацевтического состава, содержащих антитело к IL1RAP, как описано в настоящем документе.

10 Введение антитела, композиции или фармацевтического состава в соответствии со способом лечения обеспечивает индуцируемый антителом терапевтический эффект, который защищает субъекта от прогрессирования IL1RAP-опосредованного заболевания и/или обеспечивает лечение от прогрессирования IL1RAP-опосредованного заболевания у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ лечения может дополнительно включать введение одного или более дополнительных терапевтических агентов или средств лечения, известных специалистам в данной области, для предотвращения и/или лечения IL1RAP-опосредованного заболевания или состояния. Такие способы, включающие введение одного или более дополнительных агентов, могут включать комбинированное введение (когда два или более терапевтических агентов включены в один и тот же состав или в отдельные составы) и раздельное введение, и в этом случае введение композиции или состава антитела может происходить перед, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента.

25 В некоторых вариантах осуществления способов лечения настоящего описания антитело к IL1RAP или фармацевтический состав, содержащий антитело к IL1RAP, вводят субъекту любым способом введения, который позволяет доставить агент системно или к необходимой ткани-мишени. Системное введение по существу означает любой способ введения антитела субъекту в участок, отличный от непосредственного требуемого участка-мишени, ткани-мишени или органа-мишени, таким образом, что антитело или его состав попадают в систему кровообращения субъекта и, следовательно, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам.

30 Соответственно, способы введения, используемые в способах лечения настоящего описания, могут включать, без ограничений, инъекцию, инфузию, инстилляцию и ингаляцию. Введение посредством инъекции может включать внутривенную, внутримышечную, внутриаартериальную, интратекальную, интравентрикулярную, интракапсульную, интраорбитальную, интракардиальную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную, интрацереброспинальную и интратермальную инъекцию и инфузию.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав антитела к IL1RAP составляют таким

образом, что антитело защищено от инактивации в кишке. Соответственно, способ лечения может включать пероральное введение состава.

В некоторых вариантах осуществления также предложено применение композиций или составов, содержащих антитело к IL1RAP настоящего описания, в качестве лекарственного средства.

5 Дополнительно в некоторых вариантах осуществления настоящее описание также относится к применению композиции или состава, содержащих антитело к IL1RAP, в производстве или получении лекарственного средства, в частности лекарственного средства для лечения, предотвращения или
10 ослабления IL1RAP-опосредованного заболевания. В дополнительном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения, предотвращения или
ослабления IL1RAP-опосредованного заболевания, включающем введение индивидууму, имеющему IL1RAP-опосредованное заболевание, эффективного количества лекарственного средства. В некоторых
вариантах осуществления лекарственное средство дополнительно содержит эффективное количество по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента или средства лечения.

В дополнительном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в
15 лечении, ослаблении или предотвращении IL1RAP-опосредованного заболевания у субъекта, включающего введение субъекту эффективного количества лекарственного средства для лечения, ослабления или предотвращения IL1RAP-опосредованного заболевания.

В случае предотвращения или лечения IL1RAP-опосредованного заболевания или состояния подходящая
20 доза антитела к IL1RAP, содержащегося в композициях и составах настоящего описания (при применении отдельно или в комбинации с одним или более другими дополнительными терапевтическими агентами), будет зависеть от специфического заболевания или состояния, которое лечат, степени тяжести и течения
заболевания, от того, вводят ли антитело с превентивными или терапевтическими целями, от предшествующей терапии, вводимой пациенту, истории болезни пациента и ответа на антитело и от
25 решения лечащего врача. Антитело к IL1RAP, содержащееся в композициях и составах, описанных в настоящем документе, можно вводить пациенту один раз или в серии лечебных процедур. В настоящем
документе подразумеваются различные схемы дозирования, включая, без ограничений, однократное или
множественные введения в различных временных точках, болюсное введение и импульсную инфузию.

В зависимости от типа и степени тяжести заболевания начальной кандидатной дозой для введения
30 субъекту-человеку является от примерно 1 мкг до 15 мг/кг антитела к IL1RAP в составе настоящего описания в ходе, например, одного или более отдельных введений или в виде непрерывной инфузии. По существу, вводимая доза антитела будет находиться в диапазоне от примерно 0,05 мг/кг до примерно
10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления пациенту можно вводить одну или более доз, составляющих примерно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любую комбинацию этих доз).

Введение доз можно продолжать в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния
35 субъекта; например, введение можно продолжать до тех пор, пока не будет достигнут достаточный результат лечения IL1RAP-опосредованного заболевания, что определяется способами, известными специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления можно вводить начальную более

высокую насыщающую дозу с последующим введением одной или более пониженных доз. Однако можно использовать и другие схемы дозирования. Развитие терапевтического эффекта от введения доз можно контролировать с применением стандартных методик и анализов.

5 Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способов настоящего описания введение антитела к IL1RAP включает ежедневную дозу от примерно 1 мг/кг до примерно 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза антитела к IL1RAP включает ежедневную дозу по меньшей мере примерно 1 мг/кг, по меньшей мере примерно 5 мг/кг, по меньшей мере примерно 10 мг/кг, по меньшей мере примерно 20 мг/кг или по меньшей мере примерно 30 мг/кг.

10 Кроме того, антитела к IL1RAP настоящего описания можно применять в способах анализа для обнаружения IL1RAP. Благодаря их способности связываться с человеческим IL1RAP с высокой аффинностью антитела к IL1RAP, описанные в настоящем документе, пригодны для широкого диапазона способов и форматов анализа. Подразумевается, что антитела к IL1RAP могут применяться в любом известном способе анализа, таком как анализы конкурентного связывания, прямой и непрямой анализы типа «сэндвич», анализы иммунопреципитации и иммуноферментный анализы (ИФА) (см. Sola, 1987, 15 *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158, CRC Press, Inc.), для обнаружения и количественной оценки IL1RAP. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящее описание относится к способу обнаружения уровня IL1RAP в биологической пробе, включающему стадию приведения пробы в контакт с антителом к IL1RAP, описанным в настоящем документе. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления предполагается, что способ обнаружения уровня IL1RAP в 20 биологическом образце можно применять для обнаружения и/или диагностики IL1RAP-опосредованного состояния или заболевания в биологическом образце, например полученном от субъекта-человека.

Примеры

Пример 1. Получение антител к IL-1RAP

25

Способы

Рекомбинантные целевые антигены

30 Оптимизированные по составу кодонов для человека последовательности, кодирующие полноразмерный человеческий IL-1RAP (№ доступа UniProt: Q9NPH3; SEQ ID NO: 6) и полноразмерный IL-1RAP яванского макака (№ доступа: P59822, SEQ ID NO: 7), были синтезированы компанией Twist Biosciences (г. Сан-Франциско, США). Растворимые внеклеточные области человеческого IL-1RAP (остатки с 21 по 359; SEQ ID NO: 1) и IL-1RAP яванского макака (остатки с 21 по 359; SEQ ID NO: 2) клонировали в модифицированной плазмиде pcDNATM3.1 (ThermoFisher Scientific, кат. № V79020) для получения белка с С-концевой меткой AvitagTM (Avidity EEC), за которой следует метка 10-His, с линкерной

последовательностью Gly₃ между двумя метками (сокращенно: человеческий IL-1RAP-ECD-Avi-His и IL-1RAP-ECD-Avi-His яванского макака).

Экспрессионный вектор содержал последовательность, кодирующую мышинный лидерный пептид VJ2C, для обеспечения секреции продукта, а также последовательность OriP. Для экспрессии белков плазмидами, кодирующими человеческий IL-1RAP-ECD-Avi-His и IL-1RAP-ECD-Avi-His яванского макака (остатки с 21 по 359; SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно), и некодирующей плазмидой совместно трансфицировали адаптированные к росту в суспензионной культуре клетки HEK293-EBNA (ATCC-LGL standards, г. Теддингтон, Великобритания; кат. №: CRL-10852), применяя полиэтиленимин (PEI; Polysciences). Вкратце, клетки получали в концентрации 8 миллионов клеток на мл в среде RPMI 1640 (Biowest) с добавлением 0,1% Pluronic F-68 (Gibco). Затем клетки трансфицировали смесью ДНК-PEI при 37 °C. Через четыре часа после трансфекции клеточную культуру разбавляли 1 : 1 в EX-CELL® 293 (Sigma Aldrich) с добавлением фенолового красного и 4 mM L-глутамин и инкубировали в течение 5 дней на орбитальном шейкере при 37 °C, 5% CO₂ и влажности 80%. После экспрессии получали очищенные супернатанты центрифугированием и фильтрацией, доводили значение pH до 7,4 (4 °C) с помощью 1 M гидроксида натрия. К очищенному супернатанту добавляли гранулы Ni-сефарозы Excell (GE Healthcare) и инкубировали в течение ночи при 4 °C при осторожном перемешивании. Далее смеси загружали на колонки Econo-Column (Bio-Rad Laboratories) для очистки гравитационной хроматографией. Сначала гранулы промывали 1× PBS, pH 7,4 (1 × 10 объемов колонки (OK)), затем 1× PBS с добавлением 20 mM имидазола (2 × 10 OK), и белки элюировали согласно протоколу элюции белков, применяя последовательно 1× PBS, pH 7,4, с добавлением имидазола в концентрации 40 mM (10 × 1 OK), 80 mM (15 × 1 OK), 250 mM (4 × 2 OK) и 500 mM (2 × 2 OK). Фракции анализировали методом SDS-PAGE и отбирали на основании видимой чистоты. Затем представляющие интерес фракции объединяли и диализовали против 1× PBS, pH 7,4, при 4 °C. Качество белков оценивали методами SDS-PAGE, эксклюзионной ВЭЖХ и измерением уровня эндотоксинов. Вкратце, эксклюзионную ВЭЖХ проводили, применяя колонку Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWxl (кат. № 08541, Tosoh Bioscience), при комнатной температуре, с 0,1 M натрий-фосфатным буфером, содержащим 0,15 M хлорид натрия, pH 6,8, в качестве элюента, при скорости потока 1 мл/мин, на системе для ВЭЖХ Waters Alliance 2695 с детектором с фотодиодной матрицей Waters 2998 (Waters), при этом проводили измерения при длинах волн 214 нм и 280 нм. Для подтверждения уровней бактериальных эндотоксинов ниже 0,5 ЕЭ/мг применяли многокассетную систему Endosafe-MCS от компании Charles River для проведения ЛАЛ-теста (тест на основе лизата *Limulus amoebocyte*). Слитные белки с метками — IL-1RAP-ECD-Avi-His человека и яванского макака, описанные в настоящем документе, — имеют последовательности SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно.

Оптимизированные по составу кодонов для человека последовательности, кодирующие внеклеточные домены куриного IL-1RAP (№ доступа: XP_422719.4; SEQ ID NO: 3) и химерных белков курица/человек (SEQ ID NO: 4 и 5), были синтезированы компанией Eurofins (г. Эберсберг, Германия). Растворимые внеклеточные области куриного IL-1RAP (остатки со 139 по 478; SEQ ID NO: 3) и химерных белков IL-1RAP курица/человек (IL-1RAP-ECD(ggD1(S139-P246)-hsD2(V132-V233)-hsD3(V234-E359))-Avi-His и IL-1RAP-ECD(ggD1 (S139-H260)-ggD2(S261-V349)-hsD3(V243-E359))-Avi-His; SEQ ID NO: 4 и 5

соответственно) клонировали в модифицированной плазмиде pcDNATM3.1 (ThermoFisher Scientific, кат. № V79020) для получения белка с С-концевой меткой AvitagTM (Avidity LLC), за которой следует метка 10-His, с линкерной последовательностью Gly₃ между двумя метками (сокращенно: ggIL-1RAP-ECD-Avi-His; IL-1RAP-ECD(ggDI(S139-P246)-hsD2(V132-V233)- hsD3(V234-E359))-Avi-His и IL-1RAP-ECD(ggD1 (S139-H260)-ggD2(S261-V349)-hsD3 (V243-E359))-Avi-His). Экспрессионный вектор также содержал последовательность, кодирующую мышинный лидерный пептид VJ2C, для обеспечения секреции продукта, а также последовательность OriP. Для экспрессии белков вышеупомянутыми плазмидами и некодирующей плазмидой совместно трансфицировали адаптированные к росту в суспензионной культуре клетки HEK293-EBNA (ATCC-LGL standards, г. Теддингтон, Великобритания; кат. №: CRL-10852), применяя полиэтиленмин (PEI; Polysciences). Вкратце, клетки получали в концентрации 8 миллионов клеток на мл в среде RPMI 1640 (Biowest) с добавлением 0,1% Pluronic F-68 (Gibco). Затем клетки трансфицировали смесью ДНК-PEI при 37 °С. Через четыре часа после трансфекции клеточную культуру разбавляли 1 : 1 в EX-CELL[®] 293 (Sigma Aldrich) с добавлением фенолового красного и 4 мМ L-глутамин и инкубировали в течение 5 дней на орбитальном шейкере при 37 °С, 5% CO₂ и влажности 80%. Очистку рекомбинантных белков проводили согласно описанным выше стадиям, за исключением того, что на стадии элюирования использовали 1 × PBS с добавлением 500 мМ имидазола. Качество белков оценивали методами SDS-PAGE, эксклюзионной ВЭЖХ и измерением уровня эндотоксинов, как описано выше. Куриный IL-1RAP-ECD-Avi-His, IL-1RAP-ECD(ggDI(S139-P246)-hsD2(V132-V233)-hsD3(V234-E359))-Avi-His и IL-1RAP-ECD(ggD1(S139-H260)-ggD2(S261-V349)-hsD3(V243-E359))-Avi-His, описанные в настоящем документе, имеют последовательности SEQ ID NO: 3, 4 и 5 соответственно.

Рекомбинантные клеточные линии

Оптимизированную по составу кодонов для человека последовательность либо полноразмерного человеческого IL-1RAP (ID последовательности в UniProt: Q9NPH3; остатки с 1 по 570; SEQ ID NO: 6), либо полноразмерного IL-1RAP яванского макака (ID последовательности в UniProt: P59822; остатки 1–570; SEQ ID NO: 7) клонировали в модифицированной плазмиде pcDNATM3.1 (ThermoFisher Scientific, кат. № V79020). Вектор также содержал гены усиленного зеленого флуоресцентного белка (eGFP) и устойчивости к пурамицину (с расположенными между ними элементами сайтов внутренней посадки рибосомы (IRES)). Для экспрессии белков вышеупомянутыми плазмидами трансфицировали адаптированные к росту в суспензионной культуре клетки CHO-S (депонированные в банке клеток согласно cGMP, Invitrogen, кат. № A1136401), применяя полиэтиленмин (PEI; Polysciences). Вкратце, клетки получали в концентрации 2 миллиона клеток на мл в среде CD CHO (Gibco). Затем клетки трансфицировали смесью ДНК-PEI при 37 °С. Через четыре часа после трансфекции клеточную культуру разбавляли 1 : 1 в PowerCHO 2 (Lonza) с добавлением 4 мМ L-глутамин и инкубировали на орбитальном шейкере при 37 °С, 5% CO₂ и влажности 80%. Оценку экспрессии IL-1RAP человека или яванского макака осуществляли путем мониторинга экспрессии репортерного белка eGFP с помощью флуоресцентного микроскопа. Слитные белки с метками — IL-1RAP-ECD- Avi-His человека и яванского макака, описанные

в настоящем документе, — имеют последовательности SEQ ID NO: 6 и 7 соответственно.

Получение библиотеки

Библиотека, применяемая в настоящем документе, была синтетического происхождения, и ее
5 разнообразие ограничивалось тяжелой цепью (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) при фиксированной легкой
цепи Vk3-15/Jk1. Библиотека содержала 4 различные подбиблиотеки на основе антител зародышевой
линии VH1-69, VH3-23, VH3-15 и VH3-53. Рандомизацию CDR осуществляли с применением тримерных
олигонуклеотидов. Праймеры, использованные для обеспечения разнообразия CDR-H1 и CDR-H2, были
созданы для каждой подбиблиотеки и кодировали специфические для каждой зародышевой линии
10 последовательности природного происхождения с разнообразием остатков в положениях 27–35 и 50–58
соответственно (нумерация по Кабату). Рандомизацию CDR-H3 осуществляли с применением пула
олигонуклеотидов, кодирующих CDR-H3 с 15 различными длинами (6–20) и специфические для длины
последовательности природного происхождения с разнообразием остатков в положениях 95–102
(нумерация по Кабату). Различные фрагменты scFv объединяли для имитации естественного
15 распределения длин CDR-H3 и клонировали в вектор pNGLEN (модифицированный фагмидный вектор
pUC119 собственной разработки); и полученный продукт лигирования вводили электропорацией в клетки
E. coli TG1. Разнообразие каждой подбиблиотеки составляло от $1,2 \times 10^{10}$ до $1,7 \times 10^{10}$, а четыре
подбиблиотеки достигли общего разнообразия $5,6 \times 10^{10}$.

20 Отбор библиотек

Очищенные фаговые частицы из каждой подбиблиотеки объединяли ($2,5 \times 10^{11}$ бляшкообразующих
единиц/подбиблиотека) и проводили блокировку фосфатно-солевым буфером (PBS), содержащим 3%
(масс./об.) обезжиренное молоко (3% MPBS), в течение 1 ч при комнатной температуре (комн. темп.).
Магнитные гранулы Dynabeads® с белком G (Invitrogen, кат. № 10003D) и 200 нМ человеческого IgG1
25 смешивали в 3% MPBS и инкубировали в течение 1 ч при комн. темп. Проводили отсев заблокированных
фагов с применением гранул, покрытых IgG1, в течение 1 ч при комн. темп. После этого фаги
инкубировали с 50 нМ рекомбинантного слитного белка человеческий IL-1RAP-Fc (Acrobiosystems,
кат. № ILP-H5256) в течение 2 ч при комн. темп. Захват связанных с антигеном фагов гранулами с
белком G осуществляли в течение 30 мин при комн. темп., гранулы промывали пять раз буфером PBS,
30 содержащим 0,1% (об./об.) Tween (PBS-Tween 0,1%), и два раза буфером PBS. Фагов элюировали
раствором 100 мМ триэтиламина в течение 10 мин при комн. темп. и нейтрализовали с помощью 1 M Tris-
HCl, pH 8. Элюированные фаги применяли для инфицирования 10 мл культуры клеток *E. coli* TG1,
находящейся в экспоненциальной фазе роста. Затем инфицированные клетки выращивали в среде 2YT в
течение 1 ч при 37 °C и скорости вращения 100 оборотов в минуту (об/мин), после чего распределяли по
35 агару на основе 2YTAG (среда 2YT с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы) на чашках и
инкубировали в течение ночи при 30 °C. Колонии собирали с чашек в 10 мл среды 2YT и добавляли

15% глицерин (об./об.) для хранения при -80 °С. Клетки TG1 из аликвот для хранения в глицерине выращивали при 37 °С и скорости вращения 240 об/мин в среде 2YTAG до достижения оптической плотности (OD) 0,5 при длине волны 600 нм. Затем проводили суперинфекцию клеток хелперным фагом M13K07, применяя множественность заражения (MOI) 10, в течение 1 ч при 37 °С и 100 об/мин. Затем культуральную среду заменяли на 2YТАК (среда 2YT с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина) и дополнительно культивировали клетки в течение ночи при 30 °С и 280 об/мин. На следующий день 10 мкл содержащего фаги бесклеточного супернатанта применяли для последующих раундов отбора. Суммарно выполняли три раунда отбора с применением одних и тех же экспериментальных условий.

10

Скрининг scFv с помощью ППП

Для подтверждения специфической активности связывания клонов scFv применяли анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Измерения проводили на приборе Biacore 2000 (Biacore, GE Healthcare), используя программное обеспечение Biacore 2000 Control Software v3.2, при комнатной температуре; и анализ проводили с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (v3.1) от того же производителя. Рекомбинантный слитный белок человеческий IL-1RAP-Fc (Acrobiosystems, кат. № ILP-H5256) и рекомбинантный слитный белок мышиний IL-1RAP-Fc (Sino Biologicals, кат. № 52657-M02H) по отдельности разбавляли до конечной концентрации 200 нМ в ацетатном буфере, pH 4,5 (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100350), а затем иммобилизовали на Fc2 и Fc4 соответственно до уровня примерно одна тысяча резонансных единиц (сокращенно RU) на сенсорном чипе CM5 (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100012), применяя набор для иммобилизации Amine coupling kit в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве подвижного буфера применяли HBS-EP (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100188). Отфильтрованные периплазматические экстракты вводили непосредственно на сенсорный чип CM5 с ковалентно связанными человеческим IL-1RAP Fc и мышинным IL-1RAP Fc. Пробы вводили на дорожки чипа 1, 2, 3 и 4 (дорожки 1 и 3 служили в качестве контроля) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 мин, после чего следовала стадия диссоциации в течение 5 мин в подвижном буфере. После каждого события связывания проводили регенерацию поверхности с помощью раствора 10 mM глицина, pH 1,5 (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100354), вводимого в течение 1 мин при скорости 30 мкл/мин. Каждое измерение включало пробы с нулевой концентрацией, а также периплазматическими экстрактами с scFv, не имеющими отношения к исследованию, для контроля и оценки специфичности соответственно.

30

Скрининг с помощью проточной цитометрии

Связывание клонов scFv с клетками CHO, временно экспрессирующими человеческий белок IL-1RAP (SEQ ID NO. 6) или белок IL-1RAP яванского макака (SEQ ID NO. 7), оценивали с применением проточной цитометрии. Отдельные колонии *E. coli* после третьего раунда отбора собирали и выращивали

35

в среде 2TY с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 0,1% глюкозы в 96-луночной планшете с глубокими лунками. Экспрессию scFv индуцировали добавлением 0,02 мМ IPTG и инкубировали в течение ночи при 30 °С и 250 об/мин. Клетки центрифугировали и получали периплазматические экстракты путем ресуспендирования бактериального осадка в буфере TES (50 мМ Tris-HCl, pH 8; 1 мМ ЭДТА, pH 8; 20% сахара) с последующей инкубацией на льду в течение 30 мин. Остатки клеток удаляли центрифугированием и содержащие scFv супернатанты применяли в эксперименте с проточной цитометрией. Экспрессирующие IL-1RAP и нетрансфицированные клетки CHO высевали при плотности 10⁵ клеток/лунка в титрационные микропланшеты. Далее планшеты центрифугировали для удаления клеточного супернатанта и в каждую лунку добавляли 100 мкл периплазматического экстракта, предварительно разбавленного 1 : 1 в PBS, содержащем 3% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина (PBS-BSA 3%); и планшеты дополнительно инкубировали в течение 30 мин при 4 °С. Потом клетки промывали буфером PBS-BSA 3% и инкубировали с биотинилированным куриным антителом к с-Мус (Gallus Immunotech, кат. № АСМУС-В), разбавленным 1 : 200 в PBS-BSA 3%, в течение 30 мин при 4 °С. Далее клетки промывали буфером PBS- BSA 3% и инкубировали со стрептавидином APC (eBioscience, кат. № 17-4317), разведенным 1 : 100 в PBS- BSA 3%, в течение 30 мин при 4 °С. На последней стадии измеряли флуоресценцию клеток на проточном цитометре FACSCalibur (BD biosciences).

Изучение конкурентного связывания scFv с помощью ИФА

Способность клонов scFv конкурировать с антителом к IL-1RAP оценивали с применением ИФА. Слитный белок человеческий IL-1RAP-Fc (Acrobiosystems, кат. № ILP-H5256) иммобилизовали на 96-луночных титрационных микропланшетах в течение ночи при 4 °С при концентрации 1,5 мкг/мл в PBS. Затем планшеты три раза промывали PBS-Tween 0,05% и проводили блокировку с помощью PBS-BSA 3% в течение 1 ч при комн. темп. После блокировки и промывки на планшеты добавляли 50 мкл Fab в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин при комн. темп. Без промывки добавляли 50 мкл периплазматического экстракта и дополнительно инкубировали планшеты в течение 30 мин при комн. темп. Затем планшеты промывали и добавляли 50 мкл биотинилированного куриного антитела к с-Мус (Gallus Immunotech, кат. № АСМУС-В), разбавленного 1 : 5000 в PBS-BSA 3%, на 1 ч при комн. темп. После промывки на планшет добавляли стрептавидин HRP, разбавленный 1 : 8000 в PBS-BSA 0,3%, на 30 мин при комн. темп. Затем планшет промывали и проводили проявку результатов анализа с помощью ТМВ (Sigma) в течение 5 мин при комн. темп. После остановки реакции добавлением H₂SO₄ (Sigma) измеряли поглощение при длине волны 450 нм на спектрофотометре.

Экспрессия Fab и IgG1 LALA

Гены из кДНК, кодирующие различные константные области антител, были синтезированы компанией GENEART AG (г. Регенсбург, Германия) и модифицированы с применением стандартных молекулярно-биологических методик. ПЦР-продукты расщепляли соответствующими ферментами рестрикции ДНК,

очищали и лигировали в модифицированные плазмиды pcDNA3.1 (Invitrogen), которые несли промотор CMV и сигнал полиаденилирования (poly(A)) гена бычьего гормона роста. Экспрессионные векторы также содержали oriP, который является источником репликации плазмиды из вируса Эпштейна — Барр, и последовательность, кодирующую мышинный лидерный пептид VJ2C для секреции кодируемой полипептидной цепи. Для переформатирования библиотеки клонов scFv в Fab-фрагменты человеческого IgG1 или в человеческие IgG1 LALA (человеческий IgG1 с заменами L234A и L235A, система нумерации EU) каждый клон scFv в его фаговом библиотечном векторе применяли для амплификации отдельных кДНК VH с помощью ПЦР, затем ПЦР-продукт VH клонировали в модифицированном векторе pcDNA 3.1, описанном выше, ближе к 5'-концу от кДНК, кодирующей домен CH1 тяжелой цепи человеческого IgG1, или ближе к 5'-концу от кДНК, кодирующей домены CH1, шарнирный, CH2 (L234A/L235A) и CH3 тяжелой цепи человеческого IgG1, тогда как фиксированная легкая цепь Vκ3-15/Jκ1 (SEQ ID NO. 71) была клонирована в модифицированном векторе pcDNA 3.1, описанном выше, ближе к 5'-концу от кДНК, кодирующей человеческий константный домен легкой цепи каппа.

Для экспрессии Fab и IgG1 LALA равными количествами векторов для тяжелых цепей и легких цепей совместно трансфицировали адаптированные к росту в суспензионной культуре клетки HEK293-EBNA (ATCC, кат. № CRL-10852) с применением PEI. Как правило, клетки получали в концентрации 8 миллионов клеток на мл в среде RPMI с добавлением 0,1% Pluronic F-68. Затем клетки трансфицировали смесью ДНК-PEI. Через четыре часа после трансфекции клеточную культуру разбавляли 1 : 1 в EX-CELL® 293 с добавлением фенолового красного и 4 mM L-глутамина и инкубировали в течение 5 дней на орбитальном шейкере при 37 °C, 5% CO₂ и влажности 80%. Бесклеточные культуральные супернатанты, содержащие рекомбинантные белки, получали центрифугированием с последующей фильтрацией и применяли для дальнейшей очистки. Белки Fab очищали с применением аффинной матрицы Capture Select™ IgG-CH1 (ThermoScientific, кат. № ThermoScientific, кат. № 194320050), а белки IgG1 LALA очищали с применением аффинной смолы с белком A CaptivA® Protein A Affinity Resin (Repligen, кат. № CA-PRI-0100). В обоих случаях аффинную смолу добавляли к отфильтрованным культуральным супернатантам и инкубировали в течение ночи при 4 °C при осторожном перемешивании. На следующий день гранулы смолы собирали в колонки Poly-Prep (Bio-Rad Laboratories), промывали PBS и проводили элюцию рекомбинантных белков кислым буфером (в типичном случае буфером с 0,1 M глицина, pH 3). После нейтрализации 1/10 объема Tris-HCl, pH 8, проводили замену буфера в препаратах на PBS.

30

Аффинности связывания Fab с IL-1RAP

Для измерения аффинностей связывания Fab-фрагментов с IL-1RAP человека, яванского макака и/или мыши применяли поверхностный плазмонный резонанс (ППР). Аффинности измеряли на приборе Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare) при 25 °C и анализировали с применением программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (v3.1). Измерения осуществляли на сенсорных чипах серии S CM5 (Biacore T200, Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100530), покрытых антителами к области Fc человеческого IgG (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100839), с применением коммерческого набора для

35

иммобилизации Amine coupling kit (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100050), или на чипах серии S BiotinCAPture (Biacore, GE Healthcare, кат. № 28920234). Измерения ППР выполняли с применением доступного в продаже рекомбинантного слитного белка человеческий IL-1RAP-Fc (Acrobiosystems, кат. № ILP-H5256) и рекомбинантного слитного белка мышинный IL-1RAP-Fc (Sino Biologicals, кат. № 52657-M02H) или с применением биотинилированного рекомбинантного белка яванского макака IL-1RAP-avi-his собственной разработки (SEQ ID NO. 2).

Для оценки аффинностей в отношении IL-1RAP человека, яванского макака и мыши иммобилизовали IL-1RAP и в качестве аналита применяли Fab-фрагменты. Примерно 100 RU человеческого или мышинного слитного белка IL-1RAP-Fc были захвачены на fc2 сенсорного чипа серии S CM5, покрытого антителами к области Fc человеческого IgG, и примерно 150 RU биотинилированного белка IL-1RAP яванского макака были захвачены на fc2 чипа серии S BiotinCAPture. Fab-фрагменты ввели в режиме оценки кинетики в одном цикле при различных концентрациях в диапазоне от 7,8 до 500 нМ в буфере HBS-EP+ (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100669) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 мин на fc1 и fc2 (fc1 служил в качестве контроля). За диссоциацией следили в течение 5 мин. После каждого цикла поверхность регенерировали 60 мкл раствора для регенерации, поставляемого в наборе для захвата антителами к области Fc человеческого IgG (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100839) или наборе BiotinCAPture (Biacore, GE Healthcare, кат. № 28920234) соответственно. Экспериментальные данные обрабатывали с применением подгоночной кинетической модели Ленгмюра 1 : 1. Измерения включали контрольные данные для проб с нулевой концентрацией. Для оценки качества подгонки экспериментальных данных к отдельным моделям связывания применяли критерий хи-квадрат, U-критерий и значения остатков.

Анализ блокировки связывания *IL-1R1/IL-1 β* с IL-1RAP

Способность фрагментов Fab блокировать взаимодействие между IL-1RAP и комплексом рецептор/цитокин IL-1R1/IL-1 β оценивали с применением ППР. Примерно 50 RU слитного белка человеческого IL-1RAP-Fc (Acrobiosystems, кат. № ILP-H5256) иммобилизовали на fc2 сенсорного чипа серии S CM5, предварительно покрытого антителом к области Fc человеческого IgG (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100839), с применением коммерческого набора для иммобилизации Amine coupling kit (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100050). Фрагменты Fab вводили при концентрации 300 нМ в буфере HBS-EP+ в течение 4 мин в раствор над fc1 и fc2 (fc1 служил в качестве контроля) для достижения насыщения иммобилизованного человеческого IL-1RAP, затем проводили второе введение предварительно смешанного раствора IL-1R1 (R&D Systems, кат. № 296-IR-100) при концентрации 50 нМ, IL-1 β (Peprotech, кат. № 200-01B) при концентрации 100 нМ и Fab-фрагмента при концентрации 300 нМ в буфере HBS-EP+ в течение 2 мин. После каждого цикла поверхность регенерировали 60 мкл раствора для регенерации, поставляемого в наборе для захвата антителами к области Fc человеческого IgG (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100839).

Картирование домена

Домен IL-1RAP, служащий мишенью для клонов IgG1 LALA, идентифицировали с применением анализа связывания с помощью ППР. Примерно 150 RU IgG1 LALA иммобилизовали на fc2 сенсорного чипа серии S CM5, предварительно покрытого антителом к области Fc человеческого IgG (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100839), с применением коммерческого набора для иммобилизации Amine coupling kit (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100050). Человеческий IL-1RAP-avi-his, куриный IL-1RAP-avi-his, химерный белок, содержащий домен 1 куриного IL-1RAP, слитый с доменами 2 и 3 человеческого IL-1RAP (gg-hs-hs-IL-1RAP-ECD-avi-his), и химерный белок, содержащий домены 1 и 2 куриного IL-1RAP, слитые с доменом 3 человеческого IL-1RAP (gg-gg-hs-IL-1RAP-avi-his), вводили по отдельности при концентрации 50 нМ в буфере HBS-EP+ в течение 3 мин в раствор над fc1 и fc2 (fc1 служил в качестве контроля), затем проводили диссоциацию в буфере HBS-EP+ в течение 5 мин. После каждого события связывания поверхность регенерировали 60 мкл раствора для регенерации, поставляемого в наборе для захвата антителами к области Fc человеческого IgG (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100839).

Сортировка по связываемому эпитопу

Сортировку фрагментов Fab по связываемому эпитопу на человеческом IL-1RAP проводили с применением интерферометрии биослоя (BLI). Измерения осуществляли на приборе OctetRED96e (ForteBio) и данные анализировали в программном обеспечении Data Analysis HT, версия 11.1 (Octet, ForteBio). Биотинилированный человеческий белок IL-1RAP-avi-his собственной разработки (SEQ ID NO. 1) при концентрации 1 мкг/мл в буфере для оценки кинетики (ForteBio, кат. № 18-1105) наносили на биосенсор SA, покрытый стрептавидином (ForteBio, кат. № 15-5019), в течение 5 мин. Покрытый стрептавидином биосенсор с иммобилизованным на нем антигеном — биотинилированным человеческим IL-1RAP — погружали в раствор 200 нМ Fab 1 (насыщающий Fab) на 10 мин, после чего следовало погружение в смешанный раствор 200 нМ Fab 1 и 200 нМ Fab 2 (конкурирующий Fab) на 5 мин. Все стадии выполняли при 25 °C и скорости встряхивания 1000 об/мин. Перед каждым циклом для иммобилизации биотинилированного человеческого IL-1RAP применяли новые биосенсоры, покрытые стрептавидином.

Результаты

Клоны scFv, демонстрирующие специфическое связывание со слитным белком человеческий IL-1RAP-Fc по данным ППР, а также специфическое связывание с клетками CHO, экспрессирующими IL-1RAP как человека, так и яванского макака, но не демонстрирующие связывания со слитным белком мышинный IL-1RAP-Fc по данным ППР, были секвенированы, и уникальные последовательности были переформатированы в Fab-фрагмент для дальнейшего определения характеристик. Клоны scFv, демонстрирующие специфическое связывание как со слитным белком человеческий IL-1RAP-Fc, так и с гибридным белком мышинный IL-1RAP-Fc по данным ППР, а также демонстрирующие специфическое связывание с клетками CHO, экспрессирующими IL-1RAP как человека, так и яванского макака, а также конкурирующие с антителом к IL-1RAP, которое, как известно, блокирует взаимодействие между IL-1RAP и комплексом рецептор/цитокин — IL-1R1/IL-1 β , были секвенированы, и уникальные

последовательности также были переформатированы в Fab-фрагмент для дальнейшего определения характеристик. Определение биохимических характеристик включало оценку аффинностей связывания, функциональную оценку проводили с применением анализа блокировки IL-1R1/IL-1 β /IL-1RAP, и целевой эпитоп был определен с применением картирования домена и сортировки по связываемому эпитопу.

5

Аффинности связывания Fab с IL-1RAP

Двадцать четыре клон Fab продемонстрировали аффинности связывания с человеческим IL-1RAP с равновесной константой диссоциации (KD) ниже 1 мкМ по данным ППР. Клон анти-IL-1RAP-UCP02-C8, в дальнейшем также называемый анти-IL-1RAP-C8, продемонстрировал самые высокие аффинности как к человеческому IL-1RAP (2,2 нМ), так и к IL-1RAP яванского макака (2,2 нМ), но не связывался с мышинным IL-1RAP. Клон анти-IL-1RAP-UCP02-C3, в дальнейшем также называемый анти-IL-1RAP-C3, продемонстрировал высокую аффинность к мышинному IL-1RAP (0,63 нМ) и аффинность к человеческому IL-1RAP, схожую с таковой у клона анти-IL-1RAP-C8 (2,8 нМ и 2,2 нМ соответственно). Однако анти-IL-1RAP-C3 продемонстрировал примерно в 40 раз более низкую аффинность к IL-1RAP яванского макака (110 нМ), чем к человеческому IL-1RAP (2,8 нМ). Идентификационные номера последовательностей тяжелой цепи и аффинности связывания упомянутых клонов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Обзор полученных клонов Fab и их относительная аффинность к IL-1RAP человека, яванского макака и мыши

Название клона	SEQ ID NO тяжелой цепи клона	Человеческий IL-1RAP, KD (нМ)	IL-1RAP яванского макака, KD (нМ)	Мышиный IL-1RAP, KD (нМ)
Анти-IL-1RAP-UCP02-A4-Fab	SEQ ID NO. 8	84,3	103	NB
Анти-IL-1RAP-UCP02-A6-Fab	SEQ ID NO. 9	223	197	NB
Анти-IL-1RAP-UCP02-B11-Fab	SEQ ID NO. 10	98,1	78,7	NB
Анти-IL-1RAP-UCP02-B5-Fab	SEQ ID NO. 11	311	NB	NB
Анти-IL-1RAP-UCP02-C3-Fab	SEQ ID NO. 12	2,8	110	0,63
Анти-IL-1RAP-UCP02-C5-Fab	SEQ ID NO. 13	368	334	NB

Анти-IL-1RAP-UCP02-C8-Fab	SEQ ID NO. 14	2,2	2,2	NB
Анти-IL-1RAP-UCP02-C9-Fab	SEQ ID NO. 15	35,6	27,8	NB
Анти-IL-1RAP-UCP02-D2-Fab	SEQ ID NO. 16	49	50,9	NB
Анти-IL-1RAP-UCP02-G11-Fab	SEQ ID NO. 17	260	345	NB
Анти-IL-1RAP-UCP02-G3-Fab	SEQ ID NO. 18	230	296	NB
Анти-IL-1RAP-UCP02-G8-Fab	SEQ ID NO. 19	73,5	116	NB
Анти-IL-1RAP-UCP02-H8-Fab	SEQ ID NO. 20	328	297	NB
Анти-IL-1RAP-UCP02-H9-Fab	SEQ ID NO. 21	907	682	NB
Анти-IL-1RAP-UCP03-A2-Fab	SEQ ID NO. 22	582	589	NB
Анти-IL-1RAP-UCP03-A3-Fab	SEQ ID NO. 23	137	177	NB
Анти-IL-1RAP-UCP03-B4-Fab	SEQ ID NO. 24	221	220	NB
Анти-IL-1RAP-UCP03-B6-Fab	SEQ ID NO. 25	545	756	NB
Анти-IL-1RAP-UCP03-C1-Fab	SEQ ID NO. 26	573	761	NB
Анти-IL-1RAP-UCP03-C2-Fab	SEQ ID NO. 27	700	486	NB
Анти-IL-1RAP-UCP03-F4-Fab	SEQ ID NO. 28	888	1238	NB
Анти-IL-1RAP-UCP03-G3-Fab	SEQ ID NO. 29	279	464	NB
Анти-IL-1RAP-UCP03-G4-Fab	SEQ ID NO. 30	420	378	NB
Анти-IL-1RAP-UCP04-C1-Fab	SEQ ID NO. 31	16	NB	3,54

NB — связывание не поддается детекции

Анализ блокировки IL-1RAP/IL-1R1/IL-1 β

У Fab-фрагментов с KD в отношении слитного белка человеческий IL-1RAP-Fc ниже 100 нМ по данным

5 ППР изучали блокировку образования комплекса человеческий IL-1RAP/IL-1R1/IL-1 β с применением

биослойной интерферометрии Octet. У всех изученных Fab-фрагментов была подтверждена способность блокировать взаимодействие между человеческим IL-1RAP и комплексом рецептор/цитокин — IL-1R1/IL-1 β . Блокировка взаимодействия между человеческим IL-1RAP и комплексом рецептор/цитокин, IL-1R1/IL-1 β , клонами анти-IL-1RAP-C8 и анти-IL-1RAP-C3 проиллюстрирована на Фиг. 1. Клон анти-IL-1RAP-UCP05-E1, в дальнейшем также называемый анти-IL-1RAP-E1, применяли в качестве неблокирующего контроля.

Картирование домена

Для выяснения механизма действия анти-IL-1RAP-C8 и валидации клона анти-IL-1RAP-C3 в качестве подходящего мышинового заменителя эпитопа изучали домен IL-1RAP, на который нацелены оба антитела. Как описано в таблице 1, Fab-фрагмент клона анти-IL-1RAP-C3 связывается с человеческим IL-1RAP с аффинностью, схожей с таковой у Fab-фрагмента клона анти-IL-1RAP-C8. Это свойство связывания применяли для сравнения эпитопа обоих антител с помощью химерных белков IL-1RAP человек-курица. Как показано на Фиг. 2, как анти-IL-1RAP-C8, так и анти-IL-1RAP-C3 нацелены на домен 2 белка IL-1RAP, который, как известно, участвует во взаимодействии между IL-1, IL-33 и IL-36, их соответствующими рецепторами и IL-1RAP. Этот эксперимент дает информацию об эффективности блокировки клоном анти-IL-1RAP-C8 и о клоне-IL-1RAP-C3 в качестве его мышинового заменителя.

Сортировка по связываемому эпитопу

Для дальнейшей валидации анти-IL-1RAP-C3 в качестве подходящего мышинового заменителя для анти-IL-1RAP-C8 изучали конкуренцию обоих антител друг с другом с применением человеческого IL-1RAP. Этот эксперимент представлен на Фиг. 3 и демонстрирует, что оба антитела конкурируют друг с другом и распознают перекрывающиеся эпитопы на IL-1RAP. В качестве неконкурирующего контроля использовали анти-IL-1RAP-E1.

25

Пример 2. Оптимизация клона анти-IL-1RAP-C8

Рекомбинантные целевые антигены

Рекомбинантный человеческий белок IL-1RAP-ECD(S21-E359)-avi-his (SEQ ID NO. 1), в дальнейшем также называемый рекомбинантным человеческим белком IL-1RAP-avi-his, и рекомбинантный белок яванского макака IL-1RAP-ECD(S21-E359)-avi-his (SEQ ID NO. 2), в дальнейшем также называемый рекомбинантным белком яванского макака IL-1RAP-avi-his, были получены авторами изобретения самостоятельно, как описано в примере 1.

30

Получение и отбор библиотек

Пять библиотек со зрелой аффинностью получали путем внесения разнообразия в тяжелую цепь областей CDR. Рандомизацию CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 осуществляли с применением олигонуклеотидов с вырожденными кодонами NNK (где N представляет собой любой из четырех дезоксирибонуклеотидов, а К представляет собой G или T), соответствующих остаткам (по Кабату) 27–35, 50–58, 95–101 минус 2
 5 соответственно. Каждую библиотеку получали с применением перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих 5 последовательных вырожденных кодонов. Дополнительное разнообразие в CDR-H1 и CDR-H2 вносили с помощью тримерных олигонуклеотидов в положениях (по Кабату) 27–35 и 50–58 соответственно. Полученные ПЦР-продукты пяти библиотек клонировали в вектор pNGLEN
 10 (модифицированный фагмидный вектор pUC119 собственной разработки); и полученный при лигировании продукт вводили электропорацией в клетки *E. coli* TG1. Трансформированные клетки распределяли по чашкам на основе 2YTAG и инкубировали в течение ночи при 30 °С. Колонии собирали с чашек в 10 мл среды 2YT и добавляли 15% глицерин (конечная концентрация) для хранения при -80 °С. Получали фагов и очищали их в ходе двух стадий осаждения с помощью одной трети (об./об.) раствора
 15 20% PEG-6000, 2,5 М NaCl и ресуспендировали в PBS.

Отбор фагового дисплея проводили, как описано в примере 1, со следующими модификациями. Отбор каждой библиотеки со зрелой аффинностью проводили независимо. Очищенные фаговые частицы (10^{12} бляшкообразующих единиц) и покрытые стрептавидином магнитные гранулы Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 (Invitrogen, кат. № 65002) блокировали 3% MPBS в течение 1 ч при комн. темп.
 20 Отсев фагов проводили с применением гранул, предварительно заблокированных в течение 1 ч при комн. темп. Отсеянные фаги инкубировали с 5 нМ, 0,5 нМ и 0,1 нМ биотинилированного рекомбинантного человеческого белка IL-1RAP-avi-his, полученного самостоятельно (SEQ ID NO. 1), в течение раунда 1, раунда 2 и раунда 3 соответственно. После 1 ч инкубации 1 мкМ рекомбинантного человеческого белка IL-1RAP-avi-his, полученного самостоятельно (небиотинилированного, SEQ ID NO. 1), добавляли на 3 ч
 25 при комн. темп. во время раундов 2 и 3. Захват связанных с антигеном фагов на гранулах, покрытых стрептавидином, осуществляли в течение 30 мин при комн. темп., гранулы промывали пять раз буфером PBS-Tween 0,1% и два раза буфером PBS.

Измерение аффинности методом ППП

30 Для подтверждения специфической активности связывания новых клонов scFv и ранжирования клонов с положительным результатом в соответствии с их профилем связывания применяли анализ ППП. Измерения проводили на приборе Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare), используя программное обеспечение Biacore T200 Control Software v2.0, при 25 °С; анализ проводили с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (v3.1) от того же производителя. Рекомбинантный
 35 человеческий белок IL-1RAP-avi-his, полученный самостоятельно (SEQ ID NO. 1), или рекомбинантный белок яванского макака IL-1RAP-avi-his, полученный самостоятельно (SEQ ID NO. 2), разбавляли до конечной концентрации 200 нМ в ацетатном буфере, pH 4,5 (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR-1003-50),

а затем иммобилизовали на Fc2 или Fc4 соответственно до уровня примерно одна тысяча резонансных единиц (сокращенно RU) на сенсорном чипе серии S CM5 (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100530), применяя набор для иммобилизации Amine coupling kit (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100050) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве подвижного буфера применяли HBS-EP+ (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100669). Отфильтрованные периплазматические экстракты вводили непосредственно на сенсорный чип CM5 с ковалентно связанными человеческим IL-1RAP и IL-1RAP яванского макака. Пробы вводили на дорожки чипа 1, 2, 3 и 4 (дорожки 1 и 3 служили в качестве контроля) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 мин, после чего следовала стадия диссоциации в течение 5 мин в подвижном буфере. После каждого события связывания проводили регенерацию поверхности с помощью раствора 10 мМ глицина, pH 1,5 (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100354), вводимого в течение 1 мин при скорости 30 мкл/мин. Каждое измерение включало пробы с нулевой концентрацией, а также периплазматическими экстрактами с scFv, не имеющими отношения к исследованию, для контроля и оценки специфичности соответственно. После этого клоны scFv, демонстрирующие наилучшие профили связывания, были переформатированы в Fab-фрагменты, как описано в примере 1. Аффинности Fab в отношении человеческого IL-1RAP и IL-1RAP яванского макака измеряли, как описано в примере 1, но с модифицированным диапазоном концентраций вводимых Fab-фрагментов (от 0,08 нМ до 50 нМ).

Экспрессия человеческого IgG1 LALA

Клоны анти-IL-1RAP, демонстрирующие самые высокие аффинности по отношению к IL-1RAP человека и яванского макака после рекомбинации CDR, экспрессировали в формате человеческого IgG1 LALA, как описано в примере 1. Для удаления известного потенциального сайта изомеризации (DS) в CDRH3 (по Кабату) клон анти-IL-1RAP-C8-RecC (SEQ ID NO. 54) остатки D100 и S100a (по Кабату) замещали на AA, AS, DA, ES или ET соответственно в 5 дополнительных тяжелых цепях IgG1 LALA (SEQ ID NO. 55–59). кДНК, кодирующие различные варибельные области тяжелых цепей антитела в составе анти-IL-1RAP-C8-RecC-AA, анти-IL-1RAP-C8-RecC-AS, анти-IL-1RAP-C8-RecC-DA, анти-IL-1RAP-C8-RecC-ES и анти-IL-1RAP-C8-RecC-ET, были сконструированы сайт-направленным мутагенезом с применением стандартных молекулярно-биологических методик и клонированы в модифицированном векторе pcDNA 3.1 ближе к 5'-концу от кДНК, кодирующей домены CH1, CH2(L234A/L235A) и CH3 цепи человеческого IgG1, как описано в примере 1. Молекулы человеческого IgG1 LALA экспрессировали и очищали, как описано в примере 1 или как указано ниже. Для экспрессии анти-IL1-RAP-C8-RecC-ES-IgG1-LALA (SEQ ID NO: 71 и 72) равными количествами каждого из созданных генно-инженерными методами векторов, кодирующих цепи, и вектора, кодирующего ядерный антиген-1 (EBNA-1) вируса Эпштейна — Барр (EBV), совместно трансфицировали клетки CHO-S (депонированные в банке клеток согласно cGMP, Invitrogen, кат. № A1136401), применяя полиэтиленимин (PEI; Poly sciences). Как правило, клетки готовили в концентрации 8 миллионов клеток на мл в среде CD-CHO (Gibco). Затем клетки трансфицировали смесью ДНК-PEI при 37 °С. Через четыре часа после трансфекции клеточную культуру разбавляли 1 : 1 в PowerCHO™ 2 (Lonza) с добавлением 4 мМ L-глутамина и инкубировали в течение 14 дней на орбитальном шейкере при 32 °С, 5% CO₂ и влажности 80%. Очищенные супернатанты

клеточных культур, содержащие рекомбинантные белки, получали центрифугированием с последующей фильтрацией и применяли для дальнейшей очистки. Антитела очистили гравитационной хроматографией с применением смол KANEKA KanCapA™ (Kaneka) при комн. темп. К очищенному супернатанту добавляли гранулы KANEKA KanCapA™ и инкубировали в течение ночи при 4 °С при осторожном перемешивании. Далее смеси загружали на колонки Poly-Prep (Bio-Rad Laboratories) для очистки гравитационной хроматографией. Сначала гранулы промывали 1× PBS, pH 7,4 (1 × 10 ОК) и элюировали белки, как описано ниже. В случае анти-IL1-RAP-C8-RecC-ES-IgG1- LALA (SEQ ID NO: 71 и 72) белки элюировали с применением протокола ступенчатой элюции, последовательно раствором 50 мМ ацетата натрия с pH 4,3, pH 4,1, pH 3,9 и pH 3,5. Собранные фракции анализировали методом SDS-PAGE и отбирали на основании видимой чистоты. Затем представляющие интерес фракции объединяли и диализовали против 1× PBS, pH 7,4, при 4 °С. Очищенные антитела хранили при -80 °С после стерилизующей фильтрации через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Их дополнительно анализировали методом SDS-PAGE (NuPAGE на буфере Bis-Tris, 4–12% акриламид, Invitrogen AG, г. Базель, Швейцария) и методом капиллярного гель-электрофореза (cGE) на приборе ProteomeLab PA 800 (Beckman Coulter International S.A., г. Ньон, Швейцария) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях для оценки чистоты. Для определения содержания мономеров и агрегированных форм белки анализировали методом эксклюзионной ВЭЖХ. Вкратце, эксклюзионную ВЭЖХ проводили, применяя колонку Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWxl (кат. № 08541, Tosoh Bioscience), при комнатной температуре, с 0,1 М натрий-фосфатным буфером, содержащим 0,15 М хлорид натрия, pH 6,8, в качестве элюента, при скорости потока 1 мл/мин, на системе для ВЭЖХ Waters Alliance 2695 с детектором с фотодиодной матрицей Waters 2998 (Waters), при этом проводили измерения при длинах волн 214 нм и 280 нм. Для подтверждения уровней бактериальных эндотоксинов ниже 0,5 ЕЭ/мг применяли многокассетную систему Endosafe-MCS от компании Charles River для проведения ЛАЛ-теста (тест на основе лизата *Limulus amoebocyte*). Как правило, в очищенных антителах содержание агрегированных форм составляло менее 5%, и чистота по данным эксклюзионной ВЭЖХ была выше 95%.

Аффинности связывания человеческих IgG1 LALA с IL-1RAP человека и яванского макака

Для измерения аффинностей связывания молекул человеческих IgG1 LALA с IL-1RAP человека, яванского макака и/или мыши применяли поверхностный плазмонный резонанс (ППР). Аффинности измеряли на приборе Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare) при 25 °С и анализировали с применением программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (v3.1). Измерения осуществляли на сенсорных чипах серии S CM5 (Biacore T200, Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100530) с антителами к области Fc человеческого IgG (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100839) с применением коммерческого набора для иммобилизации Amine coupling kit (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100050). Измерения ППР проводили с рекомбинантным человеческим белком IL-1RAP-avi-his, полученным самостоятельно (SEQ ID NO. 1), или рекомбинантным белком яванского макака IL-1RAP-avi-his, полученным самостоятельно (SEQ ID NO. 2). Аффинности в отношении IL-1RAP человека и яванского макака оценивали путем иммобилизации молекул антител IgG1 LALA к IL-1RAP и применения белков IL-1RAP в качестве аналита. Примерно 150 RU человеческого IgG1 LALA были захвачены на fc2 сенсорного чипа серии S CM5 с антителами к области Fc человеческого IgG. Рекомбинантный человеческий белок IL-

1RAP-avi-his или рекомбинантный белок яванского макака IL-1RAP-avi-his вводили в режиме оценки кинетики в нескольких циклах при различных концентрациях в диапазоне от 0,14 до 100 нМ в буфере HBS-EP+ (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100669) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 мин на fc1 и fc2 (fc1 служил в качестве контроля). За диссоциацией следили в течение 12 мин. После каждого цикла поверхность регенерировали 60 мкл раствора для регенерации, поставляемого в наборе для захвата антителами к области Fc человеческого IgG (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100839). Экспериментальные данные обрабатывали с применением подгоночной кинетической модели Ленгмюра 1 : 1. Измерения включали контрольные данные для проб с нулевой концентрацией. Для оценки качества подгонки экспериментальных данных к отдельным моделям связывания применяли критерий хи-квадрат, U-критерий и значения остатков.

Результаты

Созревание аффинности клона анти-IL-1RAP-C8 (тяжелая цепь: SEQ ID NO. 14) включало внесение разнообразия в CDR-H1 (положения по Кабату 27–35), CDR-H2 (положения по Кабату 50–58) и CDR-H3 (положения по Кабату 95–101 минус 2) в пяти отдельных библиотеках. Выделяли клоны scFv, имеющие более низкую скорость диссоциации, чем исходный клон анти-IL-1RAP-C8, по данным измерения ППР. Клоны scFv переформатировали, экспрессировали в виде Fab-фрагментов и измеряли их аффинность в отношении IL-1RAP человека и яванского макака, как описано в примере 1. По результатам этой оценки отобранные мутации, происходящие из библиотек CDR-H1 и CDR-H2, комбинировали для дальнейшего улучшения скорости диссоциации; один клон, названный клоном Fab анти-IL-1RAP-C8-RecC, обладал самыми высокими аффинностями к человеческому IL-1RAP. Идентификационные номера последовательностей тяжелой цепи и аффинность связывания упомянутых клонов в отношении человеческого IL-1RAP представлены в таблице 2.

Таблица 2. Обзор полученных клонов Fab и их относительная аффинность к человеческому IL-1RAP

Библиотека	Название клона	Тяжелая цепь клона SEQ ID NO	Человеческий IL-1RAP, KD (нМ)
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1A-C4-Fab	SEQ ID NO. 32	0,995
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1A-C8-Fab	SEQ ID NO. 33	1,237
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1A-D8-Fab	SEQ ID NO. 34	1,515
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1A-F1-Fab	SEQ ID NO. 35	0,832
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1A-G11-Fab	SEQ ID NO. 36	0,742

CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1A-G1-Fab	SEQ ID NO. 37	0,424
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1A-G3-Fab	SEQ ID NO. 38	0,623
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1B-A8-Fab	SEQ ID NO. 39	0,522
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1B-B10-Fab	SEQ ID NO. 40	0,553
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1B-B8-Fab	SEQ ID NO. 41	0,373
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1B-D8-Fab	SEQ ID NO. 42	0,476
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1B-E7-Fab	SEQ ID NO. 43	0,831
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1B-F3-Fab	SEQ ID NO. 44	0,427
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1B-G10-Fab	SEQ ID NO. 45	0,313
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C8-H1B-H10-Fab	SEQ ID NO. 46	0,209
CDR-H2	Анти-IL-1RAP-C8-H2B-B5-Fab	SEQ ID NO. 47	1,374
CDR-H2	Анти-IL-1RAP-C8-H2B-C10-Fab	SEQ ID NO. 48	0,589
Комбинация	Анти-IL-1RAP-C8-recA-Fab	SEQ ID NO. 49	0,051
Комбинация	Анти-IL-1RAP-C8-recB-Fab	SEQ ID NO. 50	0,052
Комбинация	Анти-IL-1RAP-C8-recC-Fab	SEQ ID NO. 51	0,038

Серию из 5 мутантных версий клона анти-IL-1RAP-C8-RecC экспрессировали в каркасе человеческого IgG1 LALA, чтобы оценить удаление потенциального сайта изомеризации (DS) в CDRH3 (по Кабату). Клон анти-IL-1RAP-C8-RecC-ES продемонстрировал схожую аффинность к человеческому IL-1RAP и IL-1RAP яванского макака в сравнении с исходным клоном анти-IL-1RAP-C8-RecC и был дополнительно охарактеризован. Идентификационные номера последовательностей тяжелой цепи, а также средние константы кинетики связывания с человеческим IL-1RAP и IL-1RAP яванского макака и среднеквадратичные отклонения, рассчитанные по данным по меньшей мере двух независимых экспериментов (если применимо), для упомянутых клонов представлены в таблице 3а.

5 Последовательности CDR упомянутых клонов приведены в таблице 3б. Характерные примеры

10

сенсограмм связывания антител IgG1 LALA анти-IL-1RAP-C8-RecC-ES с IL-1RAP человека и яванского макака по данным ППР показаны на Фиг. 4.

Таблица 3а. Аффинности связывания антител IgG1 LALA с IL-1RAP человека и яванского макака по данным ППР

Название клона	Тяжелая цепь клона	Аффинность к человеческому IL-1RAP			Аффинность к IL-1RAP яванского макака		
		KD ± SD (нМ)	Ka ± SD (1/Мс)	Kd ± SD (1/с)	KD ± SD (нМ)	Ka ± SD (1/Мс)	Kd ± SD (1/с)
Анти-IL-1RAP-C8-recC IgG1 LALA	SEQ ID NO: 54	0,237 ± 0,010	8,40E+05 ± 6,73E+04	1,99E-04 ± 2,04E-05	0,276 ± 0,039	8,54E+05 ± 3,77E+04	2,36E-04 ± 2,99E-05
Анти-IL-1RAP-C8-RecC-AA-IgG1LALA	SEQ ID NO: 55	0,267 ± 0,014	6,34E+05 ± 5,66E+02	1,69E-04 ± 1,17E-05	0,240	5,77E+05	1,87E-04
Анти-IL-1RAP-C8-RecC-DA-IgG1LALA	SEQ ID NO: 56	0,140 ± 0,005	1,16E+06 ± 4,45E+04	1,62E-04 ± 1,53E-05	0,145	1,31E+06	1,90E-04
Анти-IL-1RAP-C8-RecC-AS-IgG1LALA	SEQ ID NO: 57	0,287 ± 0,007	5,61E+05 ± 1,44E+04	1,61E-04 ± 1,00E-05	0,254	6,28E+05	1,60E-04

Анти-IL-1RAP- C8-RecC-ES- IgG1LALA	SEQ ID NO: 58	0,251 ± 0,038	6,93E+0 5 ± 7,09E+0 4	1,72E- 04 ± 1,41E- 05	0,306 ± 0,026	6,92E+05 ± 4,94E+04	2,12E-04 ± 1,95E-05
Анти-IL-1RAP- C8-RecC-ET- IgG1LALA	SEQ ID NO: 59	0,278 ± 0,027	9,16E+0 5 ± 8,51E+0 4	2,53E- 04 ± 1,16E- 05	0,336	9,16E+05	3,08E-04

Таблица 3b. Последовательности CDR с нумерацией в формате по Кабату, Чотиа и IMGT

Название клона	Последовательность	SEQ ID NO
ISB 880-C8_CDRH1_Kabat 26–35	GGQFSEYAIQ	87
ISB 880-C8_CDRH1_Kabat (31–35)	EYAIQ	269
ISB 880-C8_CDRH1_Chothia (26–31)	GGQFSE	270
ISB 880-C8_CDRH1_IMGT (27–38)	GGQFSEYA	271
ISB 880-C8_CDRH2_Kabat 50–58	YIPLHGQVD	147
ISB 880-C8_CDRH2_Kabat (50–65)	YIPLHGQVDYAQKFQG	272
ISB 880-C8_CDRH2_Chothia (52–56)	IPLHGQ	273
ISB 880-C8_CDRH2_IMGT (56–65)	IPLHGQV	274
ISB 880-C8_CDRH3_Kabat 93–102	ARGQTLYDSGRQFDI	207
ISB 880-C8_CDRH3_Kabat (95–102)	GQTLYDSGRQFDI	275
ISB 880-C8_CDRH3_Chothia (95–102)	GQTLYDSGRQFDI	276
ISB 880-C8_CDRH3_IMGT (105–117)	ARGQTLYDSGRQFDI	277
ISB 880-C8-H1B-B8_CDRH1_Kabat 26–35	GSPAEPYAIQ	114

ISB 880-C8-H1B-B8_CDRH1_Kabat (31–35)	EPYAIQ	278
ISB 880-C8-H1B-B8_CDRH1_Chothia (26–31)	GSPAEP	279
ISB 880-C8-H1B-B8_CDRH1IMGT (27–38)	GSPAEPYA	280
ISB 880-C8-H1B-B8_CDRH2_Kabat 50–58	YIPLHGQVD	174
ISB 880-C8-H1B-B8_CDRH2_Kabat (50–65)	YIPLHGQVDYAQKFQG	281
ISB 880-C8-H1B-B8_CDRH2_Chothia (52–56)	IPLHGQ	282
ISB 880-C8-H1B-B8_CDRH2 IMGT (56–65)	IPLHGQV	283
ISB 880-C8-H1B-B8_CDRH3_Kabat 93–102	ARGQTYDSGRQFDI	234
ISB 880-C8-H1B-B8_CDRH3_Kabat (95–102)	GQTYDSGRQFDI	284
ISB 880-C8-H1B-B8_CDRH3_Chothia (95–102)	GQTYDSGRQFDI	285
ISB 880-C8-H1B-B8_CDRH3 IMGT (105–117)	ARGQTYDSGRQFDI	286
ISB 880-C8-H2B-C10_CDRHI_Kabat 26–35	GGQFSEYAIQ	121
ISB 880-C8-H2B-C10_CDRHI_Kabat (31–35)	EYAIQ	287

ISB 880-C8-H2B-C10_CDRH1_Chothia (26–31)	GGQFSE	288
ISB 880-C8-H2B-C10_CDRH1IMGT (27–38)	GGQFSEYA	289
ISB 880-C8-H2B-C10_CDRH2_Kabat 50–58	YIIPSLGGYD	181
ISB 880-C8-H2B-C10_CDRH2_Kabat (50–65)	YIIPSLGGYDYAQRKFG	290
ISB 880-C8-H2B-C10_CDRH2_Chothia (52–56)	IIPSLGG	291
ISB 880-C8-H2B-C10_CDRH2_IMGT (56–65)	IIPSLGGY	292
ISB 880-C8-H2B-C10_CDRH3_Kabat 93–102	ARGQTLYDSGRQFDI	241
ISB 880-C8-H2B-C10_CDRH3_Kabat (95–102)	GQTLYDSGRQFDI	293
ISB 880-C8-H2B-C10_CDRH3_Chothia (95–102)	GQTLYDSGRQFDI	294
ISB 880-C8-H2B-C10_CDRH3IMGT (105–117)	ARGQTLYDSGRQFDI	295
ISB 880-C8-recC_CDRH1_Kabat 26–35	GSPAEPYAIQ	124
ISB 880-C8-recC_CDRH1_Kabat (31–35)	EPYAIQ	296
ISB 880-C8-recC_CDRH1_Chothia (26–31)	GSPAEP	297

ISB 880-C8-recC_CDRH1_IMGT (27-38)	GSPAEPYA	298
ISB 880-C8-recC_CDRH2_Kabat 50-58	YIIPSLGGYD	184
ISB 880-C8-recC_CDRH2_Kabat (50-65)	YIIPSLGGYDYAQKFQG	299
ISB 880-C8-recC_CDRH2_Chothia (52-56)	IPSLGG	300
ISB 880-C8-recC_CDRH2_IMGT (56-65)	IIPSLGGY	301
ISB 880-C8-recC_CDRH3_Kabat 93-102	ARGQTLYDSGRQFDI	244
ISB 880-C8-recC_CDRH3_Kabat (95-102)	GQTLYDSGRQFDI	302
ISB 880-C8-recC_CDRH3_Chothia (95-102)	GQTLYDSGRQFDI	303
ISB 880-C8-recC_CDRH3_IMGT (105-117)	ARGQTLYDSGRQFDI	304
ISB 880-C8-recC-AA_CDRH1_Kabat 26-35	GSPAEPYAIQ	125
ISB 880-C8-recC-AA_CDRH1_Kabat (31-35)	EPYAIQ	305
ISB 880-C8-recC-AA_CDRHI_Chothia (26-31)	GSPAEP	306
ISB 880-C8-recC-AA_CDRH1_IMGT (27-38)	GSPAEPYA	307

ISB 880-C8-recC-AA_CDRH2_Kabat 50–58	YIIPSLGGYD	185
ISB 880-C8-recC-AA_CDRH2_Kabat (50–65)	YIIPSLGGYDYAQKFQG	308
ISB 880-C8-recC-AA_CDRH2_Chothia (52–56)	IPSLGG	309
ISB 880-C8-recC-AA_CDRH2_IMGT (56–65)	IIPSLGGY	310
ISB 880-C8-recC-AA_CDRH3_Kabat 93–102	ARGQTLYAAGRQFDI	245
ISB 880-C8-recC-AA_CDRH3_Kabat (95–102)	GQTLYAAGRQFDI	311
ISB 880-C8-recC-AA_CDRH3_Chothia (95–102)	GQTLYAAGRQFDI	312
ISB 880-C8-recC-AA_CDRH3_IMGT (105–117)	ARGQTLYAAGRQFDI	313
ISB 880-C8-recC-DA_CDRH1_Kabat 26–35	GSPAEPYAIQ	126
ISB 880-C8-recC-DA_CDRH1_Kabat (31–35)	EPYAIQ	314
ISB 880-C8-recC-DA_CDRH1_Chothia (26–31)	GSPAEP	315
ISB 880-C8-recC-DA_CDRH1_IMGT (27–38)	GSPAEPYA	316
ISB 880-C8-recC-DA_CDRH2_Kabat 50–58	YIIPSLGGYD	186

ISB 880-C8-recC-DA_CDRH2_Kabat (50–65)	YIIPSLGGYDYAQKFQG	317
ISB 880-C8-recC-DA_CDRH2_Chothia (52–56)	IPSLGG	318
ISB 880-C8-recC-DA_CDRH2_IMGT (56–65)	IIPSLGGY	319
ISB 880-C8-recC-DA_CDRH3_Kabat 93–102	ARGQTLYDAGRQFDI	246
ISB 880-C8-recC-DA_CDRH3_Kabat (95–102)	GQTLYDAGRQFDI	320
ISB 880-C8-recC-DA_CDRH3_Chothia (95–102)	GQTLYDAGRQFDI	321
ISB 880-C8-recC-DA_CDRH3_IMGT (105–117)	ARGQTLYDAGRQFDI	322
ISB 880-C8-recC-AS_CDRH1_Kabat 26–35	GSPAEPYAIQ	127
ISB 880-C8-recC-AS_CDRH1_Kabat (31–35)	EPYAIQ	323
ISB 880-C8-recC-AS_CDRH1_Chothia (26–31)	GSPAEP	324
ISB 880-C8-recC-AS_CDRH1_IMGT (27–38)	GSPAEPYA	325
ISB 880-C8-recC-AS_CDRH2_Kabat 50–58	YIIPSLGGYD	187
ISB 880-C8-recC-AS_CDRH2_Kabat (50–65)	YIIPSLGGYDYAQKFQG	326

ISB 880-C8-recC-AS_CDRH2_Chothia (52-56)	IPSLGG	327
ISB 880-C8-recC-AS_CDRH2_IMGT (56-65)	IIPSLGGY	328
ISB 880-C8-recC-AS_CDRH3_Kabat 93-102	ARGQTLYASGRQFDI	247
ISB 880-C8-recC-AS_CDRH3_Kabat (95-102)	GQTLYASGRQFDI	329
ISB 880-C8-recC-AS_CDRH3_Chothia (95-102)	GQTLYASGRQFDI	330
ISB 880-C8-recC-AS_CDRH3_IMGT (105-117)	ARGQTLYASGRQFDI	331
ISB 880-C8-recC-ES CDRHI Kabat 26-35	GSPAEPYAIQ	128
ISB 880-C8-recC-ES CDRHI Kabat (31-35)	EPYAIQ	332
ISB 880-C8-recC-ES CDRHI Chothia (26-31)	GSPAEP	333
ISB 880-C8-recC-ES_CDRH1_IMGT (27-38)	GSPAEPYA	334
ISB 880-C8-recC-ES_CDRH2_Kabat 50-58	YIIPSLGGYD	188
ISB 880-C8-recC-ES_CDRH2_Kabat (50-65)	YIIPSLGGYDYAQKFQG	335
ISB 880-C8-recC-ES_CDRH2_Chothia (52-56)	IPSLGG	336

ISB 880-C8-recC-ES_CDRH2_IMGT (56–65)	IIPSLGGY	337
ISB 880-C8-recC-ES_CDRH3_Kabat 93–102	ARGQTLYESGRQFDI	248
ISB 880-C8-recC-ES_CDRH3_Kabat (95–102)	GQTLYESGRQFDI	338
ISB 880-C8-recC-ES_CDRH3_Chothia (95–102)	GQTLYESGRQFDI	339
ISB 880-C8-recC-ES_CDRH3_IMGT (105–117)	ARGQTLYESGRQFDI	340
ISB 880-C8-recC-ET_CDRHI_Kabat 26–35	GSPAEPYAIQ	129
ISB 880-C8-recC-ET_CDRHI_Kabat (31–35)	EPYAIQ	341
ISB 880-C8-recC-ET_CDRHI_Chothia (26–31)	GSPAEP	342
ISB 880-C8-recC-ET_CDRH1_IMGT (27–38)	GSPAEPYA	343
ISB 880-C8-recC-ET_CDRH2_Kabat 50–58	YIIPSLGGYD	189
ISB 880-C8-recC-ET_CDRH2_Kabat (50–65)	YIIPSLGGYDYAQKFQG	344
ISB 880-C8-recC-ET_CDRH2_Chothia (52–56)	IIPSLGG	345
ISB 880-C8-recC-ET_CDRH2_IMGT (56–65)	IIPSLGGY	346

ISB 880-C8-recC-ET_CDRH3_Kabat 93–102	ARGQTLYETGRQFDI	249
ISB 880-C8-recC-ET_CDRH3_Kabat (95–102)	GQTLYETGRQFDI	347
ISB 880-C8-recC-ET_CDRH3_Chothia (95–102)	GQTLYETGRQFDI	348
ISB 880-C8-recC-ET_CDRH3_IMGT (105–117)	ARGQTLYETGRQFDI	349

Пример 3. Оптимизация клона анти-IL-1RAP-C3

Рекомбинантные целевые антигены

Рекомбинантный человеческий белок IL-1RAP-ECD(S21-E359)-avi-his (SEQ ID NO. 1), в дальнейшем
 5 называемый рекомбинантным человеческим белком IL-1RAP-avi-his, был получен самостоятельно, как описано в примере 1.

Получение и отбор библиотек

Созревание аффинности клона анти-IL-1RAP-C3 проводили, как описано в примере 2, со следующими
 10 модификациями. Очищенные фаговые частицы (10^{12} бляшкообразующих единиц) и покрытые белком G магнитные гранулы Dynabeads® Protein G (Novex, Life technologies) блокировали 3% MPBS в течение 1 ч при комн. темп. 200 нМ человеческого IgG1 было захвачено на заблокированных гранулах с белком G в течение 30 мин при комн. темп. Далее проводили отсев заблокированных фагов с применением гранул, покрытых IgG1, в течение 1 ч при комн. темп. Затем отсеянные фаги инкубировали с 1 нМ, 0,5 нМ и
 15 0,1 нМ мышинового IL-1RAP-Fc (Sino Biological, кат. № 52657-M02H) в течение раунда 1, раунда 2 и раунда 3 соответственно. После 1 ч инкубации 1 мкМ рекомбинантного человеческого белка IL-1RAP-avi-his, полученного самостоятельно (небиотинилированного, SEQ ID NO. 1), добавляли на 3 ч при комн. темп. во время раундов 2 и 3. Захват связанных с антигеном фагов гранулами с белком G осуществляли в течение 30 мин при комн. темп. и гранулы промывали пять раз буфером PBS-Tween 0,1% и два раза PBS.

20 *Измерение аффинности методом ППП*

Для подтверждения специфической активности связывания новых клонов scFv и ранжирования клонов с положительным результатом в соответствии с их профилем связывания применяли анализ ППП. Измерения проводили, как описано в примере 2, со следующими модификациями. Рекомбинантный

мышинный IL-1RAP-Fc (Sino Biological, кат. № 52657-M02H) разбавляли до конечной концентрации 200 нМ в ацетатном буфере, pH 4,5 (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100350), а затем иммобилизовали на fc2 до уровня примерно 1500 RU на сенсорном чипе серии S CM5 (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100530), применяя набор для иммобилизации Amine coupling kit в соответствии с рекомендациями производителя. Отфильтрованные периплазматические экстракты вводили непосредственно на сенсорный чип CM5 с ковалентно связанным мышинным IL-1RAP-Fc на дорожки 1 и 2 (дорожка 1 служила в качестве контроля). Клоны scFv, демонстрирующие наилучшие профили связывания, были переформатированы в Fab-фрагменты, как описано в примере 1.

Аффинности Fab-фрагментов к мышинному IL-1RAP измеряли, как описано в примере 1, со следующими модификациями. Измерения осуществляли на сенсорных чипах серии S CM5 (Biacore T200, Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100530) с антителами к области Fc человеческого IgG (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100839) с применением коммерческого набора для иммобилизации Amine coupling kit (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100050). Измерения ППП выполняли с применением доступного в продаже рекомбинантного слитного белка мышинного IL-1RAP-Fc (Sino Biologicals, кат. № 52657-M02H). Для оценки аффинностей в отношении мышинного IL-1RAP иммобилизовали мышинный IL-1RAP-Fc и в качестве аналита применяли Fab-фрагменты. Примерно 60 RU слитного белка мышинного IL-1RAP-Fc были захвачены на fc2 сенсорного чипа серии S CM5, покрытого антителами к области Fc человеческого IgG. Fab-фрагменты вводили в режиме оценки кинетики в одном цикле при различных концентрациях в диапазоне от 0,04 до 5 нМ в буфере HBS-EP+ (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100669) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 мин на fc1 и fc2 (fc1 служил в качестве контроля). За диссоциацией следили в течение 10 мин.

Экспрессия мышинного IgG2a LALA

Для экспрессии анти-IL-1RAP-C3-A3-mmIgG2a-LALA (SEQ ID NO: 73 и 74) равными количествами каждого из созданных генно-инженерными методами векторов совместно трансфицировали адаптированные к росту в суспензионной культуре клетки HEK293-EBNA (ATCC-LGL standards, г. Теддингтон, Великобритания; кат. №: CRL-10852), применяя полиэтиленмин (PEI; Poly sciences). Как правило, клетки готовили в концентрации 8 миллионов клеток на мл в среде RPMI 1640 (Biowest) с добавлением 0,1% Pluronic F-68 (Gibco). Затем клетки трансфицировали смесью ДНК-PEI при 37 °C. Через четыре часа после трансфекции клеточную культуру разбавляли 1 : 1 в EX-CELL® 293 с добавлением фенолового красного или BalanCD HEK293 (Irvine Scientific) и 4 mM L-глутамина и инкубировали в течение 5 дней на орбитальном шейкере при 37 °C, 5% CO₂ и влажности 80%. Бесклеточные культуральные супернатанты, содержащие рекомбинантные белки, получали центрифугированием с последующей фильтрацией и применяли для дальнейшей очистки. Антитела очищали, как описано для анти-IL1-RAP-C8-RecC-ES-IgG1-LALA в примере 2, со следующими модификациями. В случае анти-IL-1RAP-C3-A3-mmIgG2a-LALA (SEQ ID NO: 73 и 74) белки элюировали кислым буфером (как правило, буфером с 0,1 M глицина, pH 3,5). Собранные фракции анализировали методом SDS-PAGE и отбирали на основании видимой чистоты. Затем представляющие интерес фракции объединяли и диализовали против 1× PBS, pH 7,4, при 4 °C. Очищенные антитела хранили при -80 °C

после стерилизующей фильтрации через фильтр с размером пор 0,2 мкм и дополнительно анализировали, как описано для анти-IL-1-RAP-C8-RecC-ES-IgG1-LALA в примере 2.

Аффинности связывания мышиных IgG2a LALA с мышиным IL-1RAP

Для измерения аффинностей связывания молекул мышиных IgG2a LALA с мышиным IL-1RAP применяли поверхностный плазмонный резонанс (ППР). Аффинность измеряли на приборе Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare) при 25 °C и анализировали с применением программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (v3.1). Измерения осуществляли на сенсорных чипах серии S CM5 (Biacore T200, Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100530), покрытых антителами к области Fc мышиного IgG (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100838), с применением коммерческого набора для иммобилизации Amine coupling kit (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100050). Измерения ППР выполняли с применением доступного в продаже рекомбинантного мышиного IL-1RAP-his (Sino Biologicals, кат. № 52657-M08H). Аффинность в отношении мышиного IL-1RAP оценивали путем иммобилизации молекул мышиных антител IgG2a LALA к мышиному IL-1RAP и применения мышиного белка IL-1RAP в качестве аналита. Примерно 150 RU мышиного IgG2a LALA были захвачены на fc2 сенсорного чипа серии S CM5, покрытого антителами к области Fc мышиного IgG. Мышиный IL-1RAP-his водили в режиме оценки кинетики в нескольких циклах при различных концентрациях в диапазоне от 0,14 до 100 нМ в буфере HBS-EP+ (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100669) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 мин на fc1 и fc2 (fc1 служил в качестве контроля). За диссоциацией следили в течение 15 мин. После каждого цикла поверхность регенерировали 60 мкл раствора для регенерации, поставляемого в наборе для захвата антителами к области Fc мышиного IgG (Biacore, GE Healthcare, кат. № BR100838). Экспериментальные данные обрабатывали с применением подгоночной кинетической модели Ленгмюра 1 : 1. Измерения включали контрольные данные для проб с нулевой концентрацией. Для оценки качества подгонки экспериментальных данных к отдельным моделям связывания применяли критерий хи-квадрат, U-критерий и значения остатков.

25

Результаты

Созревание аффинности клона анти-IL-1RAP-C3 (SEQ ID NO. 12) включало внесение разнообразия в CDR-H1 (положения по Кабату 27–35), CDR-H2 (положения по Кабату 50–53 и 55–58) и CDR-H3 (положения по Кабату 95–101 минус 2) в пяти отдельных библиотеках. Выделяли клоны scFv, имеющие более низкую скорость диссоциации, чем исходный клон анти-IL-1RAP-C3, по данным измерения ППР. Отобранные клоны scFv переформатировали, экспрессировали в виде Fab-фрагментов и измеряли их аффинность в отношении IL-1RAP человека и яванского макака, как описано в примере 1. Один клон, названный клоном Fab анти-IL-1RAP-C3-A3, обладал самой высокой аффинностью к мышиному IL-1RAP. Идентификационные номера последовательностей тяжелой цепи и аффинность связывания упомянутых клонов представлены в таблице 4.

35

Таблица 4. Обзор полученных клонов Fab и их относительная аффинность к мышиному IL-1RAP

Библиотека	Название клона	Тяжелая цепь клона SEQ ID NO	Мышиный IL-1RAP, KD (нМ)
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C3-MP01-A2 Fab	SEQ ID NO. 60	0,68
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C3 -MP01-A3 Fab	SEQ ID NO. 61	0,14
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C3-MP01-B5 Fab	SEQ ID NO. 62	0,21
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C3 -MP01-B7 Fab	SEQ ID NO. 63	0,17
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C3 -MP01-D2 Fab	SEQ ID NO. 64	0,22
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C3 -MP01-F5 Fab	SEQ ID NO. 65	0,28
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C3 -MP01-G10 Fab	SEQ ID NO. 66	0,21
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C3-MP02-B8 Fab	SEQ ID NO. 67	0,49
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C3 -MP02-F6 Fab	SEQ ID NO. 68	0,26
CDR-H1	Анти-IL-1RAP-C3 -MP02-G2 Fab	SEQ ID NO. 69	0,32
CDR-H3	Анти-1RAP-C3 -UCPO1-H4 Fab	SEQ ID NO. 70	0,45

Клон анти-IL-1RAP-C3-A3 отобрали в качестве потенциального мышинового заменителя для кандидата к человеческому IL-1RAP и экспрессировали в каркасе мышинового IgG2a LALA, являющегося эквивалентом человеческого изотипа IgG1 LALA у мышей. Идентификационные номера последовательностей, а также средние константы кинетики связывания с человеческим IL-1RAP или мышинным IL-1RAP и среднеквадратичные отклонения, рассчитанные по данным по меньшей мере двух независимых экспериментов, для упомянутых клонов представлены в таблице 5. Клон анти-IL-1RAP-C3-A3 не продемонстрировал какого-либо обнаруживаемого связывания с IL-1RAP яванского макака по данным ППР (данные не показаны). Идентификационные номера последовательностей, а также средние константы кинетики связывания с мышинным IL-1RAP и среднеквадратичные отклонения, рассчитанные по данным трех независимых экспериментов, для упомянутых клонов представлены в таблице 5. Один характерный пример сенсограммы связывания антитела mmIgG2a LALA анти-IL-1RAP-C3-A3 с мышинным IL-1RAP по данным ППР показан на Фиг. 5.

Таблица 5. Аффинности связывания мышиных IgG2a LALA с мышиным IL-1RAP по данным ППП

Название клона	SEQ ID NO тяжелой цепи клона	Легкая цепь клона, SEQ ID NO	Аффинность к человеческому IL-1RAP			Аффинность к мышиному I		L-1RAP
			KD ± SD (нМ)	Ka ± SD (1/Мс)	Kd ± SD (1/с)	KD ± SD (нМ)	Ka ± SD (1/Мс)	Kd ± SD (1/с)
mmIgG2a LALA анти-IL-1RAP-C3-A3	SEQ ID NO. 73	SEQ ID NO. 74	14,0 ± 0,01	6,41E+03 ± 1,03E+03	8,97E-04 ± 1,42E-04	0,545 ± 0,091	1,38E+05 ± 6,98E+03	7,46E-05 ± 9,24E-06

Пример 4. Определение биологических характеристик in vitro кандидата 1 к человеческому IL-1RAP

5 4.1 Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP специфически связывается с человеческим IL-1RAP

Связывание кандидата 1 к человеческому IL-1RAP (называется в настоящем документе анти-IL1RAP-C8-RecC и содержит области CDR тяжелой цепи с SEQ ID No: 128, 188 и 248 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 71) с мембраносвязанным человеческим IL-1RAP оценивали проточной цитометрией с применением множества клеточных линий человека и типов клеток человека, таких как клеточная линия кератиноцитов HaCaT (AddexBio, T0020001), а также первичных клеток человека (человеческие нейтрофилы и фибробласты).

Вкратце, клетки собирали, подсчитывали и высевали на 96-луночный круглодонный планшет по 50 000 клеток/лунка. Планшет центрифугировали при 350g в течение 3 минут и ресуспендировали клетки в 50 мкл буфера для цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) (PBS (1 ×) + 2,5% сыворотки плодов крупного рогатого скота (FCS) + 2 мМ ЭДТА + 0,05% NaN₃), содержащего различные концентрации (в диапазоне от 50 до 0,00003 мкг/мл) либо кандидата 1 к человеческому IL-1RAP, либо антител изотипического контроля 5. Окрашенные клетки инкубировали в течение 30 минут при 4 °C, дважды промывали буфером для FACS при 350g в течение 3 мин и ресуспендировали в 100 мкл моноклонального второго антитела к человеческому IgG PE-Cyanine7 (Biolegend, 409316), разбавленного 1 : 200 в буфере для FACS. Затем клетки дважды промывали и ресуспендировали в 200 мкл буфера для FACS, содержащего краситель для окрашивания мертвых клеток SYTOX Green (ThermoFisher Scientific, S34860), и пробы вносили в прибор CytoFlex (Beckman Coulter). Клетки гейтировали по размеру на двумерных гистограммах FSC/SSC и анализировали геометрические средние (геом. ср.) интенсивности флуоресценции PE-Cyanine7 с применением программного обеспечения FlowJo. Наконец, рассчитали относительные геом. ср. интенсивности флуоресценции путем вычитания флуоресценции кандидата 1 к человеческому IL-1RAP из флуоресценции изотипического контроля 5. Как показано на Фиг. 6, кандидатное антитело 1 к человеческому IL-1RAP распознает мембраносвязанный IL-1RAP, экспрессируемый на клетках линии HaCaT и всех первичных клетках. Проводили множество независимых экспериментов с клетками от множества доноров. Сводная

информация о соответствующих значениях Kd представлена в таблице 6.

Таблица 6

Тип клеток	N	KD \pm SD (нМ)
Клеточная линия HaCaT	4	0,75 \pm 0,36
HaCaT, нокаутная по гену IL-1RAP	3	Н/П
Человеческие нейтрофилы	6	1,67 \pm 0,96
Нормальный фибробласт яванского макака	4	1,55 \pm 1,45
Нормальный человеческий фибробласт	4	3,1 \pm 2,14

5 В таблице 6 приведены значения KD, определенные по данным экспериментов с применением проточной цитометрии, в которых кандидат 1 к человеческому IL-1RAP (●) или изотипический контроль 3 (■) (Фиг. 6) инкубировали с различными клеточными линиями и типами клеток. Значения KD были получены с применением функции нелинейной сигмоидальной регрессии. В сводную таблицу были включены кривые, демонстрирующие достаточно хорошее соответствие модели ($R^2 > 0,7$).

10 Для дополнительной демонстрации селективного связывания кандидата 1 к человеческому IL-1RAP с IL-1RAP ту же самую процедуру выполняли в отношении клеточной линии HaCaT, нокаутной по гену белка IL-1RAP, которая была ранее создана и охарактеризована авторами изобретения. Эксперимент проводили в соответствии с тем же протоколом, что описан выше. Результаты на Фиг. 6 демонстрируют, что кандидатное антитело 1 к человеческому IL-1RAP селективно связывается с мембраносвязанным IL-1RAP, так как оно не связывается с клеточной линией HaCaT, нокаутной по гену IL-1RAP.

15 **4.2 Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP связывается с IL-1RAP яванского макака на первичных клетках низших обезьян**

Для оценки перекрестной реактивности кандидата 1 к человеческому IL-1RAP в отношении IL-1RAP яванского макака проводили ту же процедуру, которая описана выше, с применением фибробластов обезьян. В этом анализе кандидат 1 к человеческому IL-1RAP связывался с фибробластами, экспрессирующими IL-1RAP яванского макака (Фиг. 6). Сводная информация о значениях Kd для изученных типов клеток представлена в таблице 6.

20 **4.3 Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует высвобождение цитокинов, индуцируемое как IL-1, так и IL-36, в анализе стимуляции клеток HaCaT**

25 Для оценки способности кандидата 1 к человеческому IL-1RAP ингибировать пути IL-1, IL-33 и IL-36 были разработаны несколько анализов с применением различных клеточных систем. Клеточную линию кератиноцитов HaCaT применяли для изучения ингибирования путей IL-1 и IL-36, так как эта конкретная клеточная линия чувствительна к цитокинам IL-1 и IL-36, но не к IL-33, что определяют по выработке нижележащих медиаторов, таких как IL-6 и IL-8 (CXCL8).

Вкратце, клетки HaCaT собирали, подсчитывали и ресуспендировали до концентрации

0,05 × 10⁶ клеток/мл в полной среде DMEM (DMEM + 10% FBS + 1% глутамин + 1% пенициллин/стрептомицин + 1% заменимые аминокислоты (NEAA) + 1% пируват натрия (NaPyru)). По сто мкл клеток распределяли в 96-луночном плоскодонном планшете и инкубировали при 37 °С, 5% CO₂ в течение 16 ч. На следующий день клетки инкубировали с 5 50 мкл либо кандидата 1 к человеческому IL-1RAP (диапазон от 50 до 0,000005 мкг/мл), либо изотипического контроля 5 (одна доза 50 мкг/мл) в виде серии разведений в среде для анализа (полная среда DMEM) в течение 30 минут. В конце инкубации в соответствующие лунки вносили 50 мкл либо человеческого IL-1β, либо человеческого IL-36γ (оба получены от Peprotech). После 24 ч инкубации при 37 °С, 5% CO₂ 100 мкл супернатантов переносили на 96-луночный круглодонный планшет и хранили в 10 морозильной камере при -80 °С до количественного определения цитокинов/хемокинов. Выработку IL-6 и IL-8 в культуральных супернатантах измеряли с применением Luminex и наборов ProcartaPlex (ThermoFisher Scientific, EPX01A-10213-901 и EPX01A-10204-901), следуя инструкциям производителей.

Как изображено на Фиг. 7, кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует высвобождение как цитокина IL-6, так и хемокина IL-8 при стимуляции клеток HaCaT IL-1β или IL-36γ. Этот эффект является 15 дозозависимым для обоих путей и даже более сильным в случае IL-36γ, так как взаимодействия, приводящие к образованию тримерного комплекса IL-36/IL-36R/IL-1RAP, слабее, чем взаимодействия, регулирующие образование комплекса IL-1/IL-1R/IL-1RAP. Во всех анализах были установлены и применены критерии включения, чтобы обеспечить достаточный диапазон стимуляции или индекс стимуляции (SI) для определения процентной доли ингибирования. Индекс стимуляции рассчитывали по 20 следующей формуле:

$$\text{Индекс стимуляции} = \frac{\text{Высвобождение цитокина } X_{\text{только цитокин}}}{\text{Высвобождение цитокина } X_{\text{только клетки}}}$$

- X является рассматриваемым цитокином (IL-6 или IL-8);

- «только цитокин» — это условия, при которых клетки инкубировали только со стимулятором (IL-1β или IL-36γ);

25 - «только клетки» — это условия, при которых клетки инкубировали в среде.

Проводили два независимых эксперимента, и сводная информация по значениям EC₅₀ ингибирования приведена в таблице 7.

Таблица 7. Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует высвобождение цитокинов, индуцируемое как IL-1, так и IL-36, в анализе стимуляции клеток HaCaT.

Стимулятор	Считываемое показание	N	EC20	EC50	EC80	Макс. ингибирование
IL-1b	IL-6	1	2,19	8,77	35,05	106,21
IL-1b	IL-8	2	0,88 ± 0,34	3,53 ± 1,38	14,11 ± 5,5	94,65 ± 3,5
IL-36g	IL-6	2	0,04 ± 0,03	0,17 ± 0,12	0,67 ± 0,5	107,6 ± 3,87

IL-36g	IL-8	2	0,03 ± 0,02	0,11 ± 0,07	0,45 ± 0,29	98,61 ± 0,75
---------------	------	---	-------------	-------------	-------------	--------------

В таблице показаны значения EC_{20} , EC_{50} , EC_{80} и максимального ингибирования, определенные в анализе стимуляции, в котором кандидата 1 к человеческому IL-1RAP (●) или изотипический контроль 3 (■) (Фиг. 7) инкубировали с клетками HaCaT, стимулированными IL-1 β или IL-36 γ . Значения EC_x были получены с применением функции нелинейной сигмоидальной регрессии. В сводную таблицу были включены данные экспериментов в условиях достаточной стимуляции (индекс стимуляции > 1,8) и кривые, демонстрирующие достаточно хорошее соответствие модели ($R^2 > 0,7$).

4.4 Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует индуцированное IL-33 высвобождение цитокинов в анализе стимуляции человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC)

10 Для изучения ингибирования пути IL-33 в анализе с костимуляцией IL-12 применяли человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (hPBMC). В литературе сообщалось, что IL-12 или IL-33 по отдельности не запускают минимальную выработку IFN-g в клетках hPBMC, тогда как комбинированная обработка IL-33 и IL-12 приводила к синергичной выработке IFN-g (Smithgall et al., 2008; Ochayon et al., 2019).

15 Вкратце, hPBMC собирали из лейкоцитных пленок, полученных от центра переливания в Ла-Шо-де-Фон (Швейцария), с применением выделения в градиенте плотности фиколла. Клетки подсчитывали и ресуспендировали до концентрации 1×10^6 клеток/мл в полной среде RPMI (RPMI + 10% FBS + 1% глутамин + 1% пенициллин/стрептомицин). Сто мкл hPBMC распределяли на 96-луночном круглодонном планшете. Клетки инкубировали с 50 мкл человеческих IL-12 и IL-33 (оба от
20 компании Reprotech) в течение 15 минут. В конце инкубации в соответствующие лунки добавляли по 50 мкл кандидата 1 к человеческому IL-1RAP (диапазон от 50 до 0,000005 мкг/мл) в виде серии разведений в среде для анализа (полная среда RPMI). Антитело изотипического контроля 5 тестировали в одной дозе 50 мкг/мл. После 48 ч инкубации при 37 °C, 5% CO₂ 100 мкл супернатантов переносили на 96-луночный круглодонный планшет и хранили в морозильной камере при -80 °C до проведения
25 количественного определения уровней цитокинов. Выработку IFN-g в культуральных супернатантах измеряли с применением Luminox и наборов ProcartaPlex (ThermoFisher Scientific, EPX01A-10228-901), следуя инструкциям производителей. Ту же процедуру проводили с применением вместо IL-33 + IL-12 стимуляции IL-1 β , приводящей к высвобождению IL-8.

30 Как изображено на Фиг. 8 (серые кривые, нижняя фигура), кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует высвобождение цитокина IFN-g при одновременной стимуляции клеток PBMC IL-12 и IL-33. Эффект является дозозависимым.

Кроме того, сообщалось, что IL-1RAP может быть обнаружен в виде растворимой молекулы в периферической крови в концентрации, достигающей приблизительно 300 нг/мл. Для оценки того, способен ли кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибировать пути IL-1/IL-33 в присутствии
35 растворимого IL-1RAP, проводили ту же экспериментальную процедуру, что описана выше, с

добавлением растворимого IL-1RAP в смеси цитокинов IL-1 β или IL-12+IL-33. Результаты, показанные на Фиг. 8, демонстрируют, что кандидат 1 к человеческому IL-1RAP может конкурировать с растворимым IL-1RAP и сохраняет свою способность блокировать высвобождение цитокинов при стимулировании человеческих PBMC IL-1b и IL-33.

- 5 Проводили два независимых эксперимента суммарно с 6 донорами. Значения EC₅₀ ингибирования представлены в таблице 8.

Таблица 8. Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует индуцированное IL-33 высвобождение цитокинов в анализе стимуляции человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

Стимулятор	Считываемое показание	Растворимый IL-1RAP	N	EC20	EC50	EC80	Макс. ингибирование
IL-1b	IL-6	Отсутствие	6	0,01 \pm 0,01	0,04 \pm 0,04	0,17 \pm 0,15	98,82 \pm 2,64
IL-1b	IL-8	Отсутствие	6	0,02 \pm 0,01	0,08 \pm 0,05	0,33 \pm 0,18	92,19 \pm 3,47
IL-1b	IL-6	Наличие	6	1,94 \pm 1,41	7,76 \pm 5,64	31,06 \pm 22,60	114,25 \pm 1,04
IL-1b	IL-8	Наличие	6	2,61 \pm 2,04	10,44 \pm 8,15	41,77 \pm 32,60	107,62 \pm 10,71
IL-33/IL-12	IFNg	Отсутствие	6	2,07 \pm 2,91	8,28 \pm 11,65	33,10 \pm 46,61	93,19 \pm 6,78
IL-33/IL-12	IFNg	Наличие	5	14,54 \pm 19,5	58,16 \pm 77,82	232,56 \pm 311,09	143,98 \pm 58,06

- 10 В таблице 8 показаны значения EC₂₀, EC₅₀, EC₈₀ и максимального ингибирования, определенные в анализе стимуляции, в котором кандидата 1 к человеческому IL-1RAP (●) или изотипический контроль 3 (■) (Фиг. 8) инкубировали с клетками PBMC, стимулированными IL-1 β или IL-12+IL-33. Значения EC_x были получены с применением функции нелинейной сигмоидальной регрессии.

В сводную таблицу были включены данные экспериментов в условиях достаточной стимуляции (индекс стимуляции > 1,8) и кривые, демонстрирующие достаточно хорошее соответствие модели (R² > 0,7).

- 15 Вместе эти данные демонстрируют, что кандидат 1 к человеческому IL-1RAP эффективно ингибирует все отдельные пути при применении связанных с заболеваниями человека видов клеточного анализа.

4.5 Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует высвобождение цитокинов в анализе повторной стимуляции в цельной крови при комбинированной цитокиновой стимуляции

- 20 Хотя предшествующие анализы позволили оценить способность кандидата 1 к человеческому IL-1RAP ингибировать отдельные пути, анализ в цельной крови применяли для оценки способности кандидата 1 к человеческому IL-1RAP ингибировать пути, стимулированные комбинацией IL-1, IL-33 и IL-36. Свежеполученную человеческую кровь от здоровых доноров (в цитратных пробирках) распределяли по пробиркам вместимостью 15 мл и проводили предварительную инкубацию либо только со средой (RPMI), либо с кандидатом 1 к человеческому IL-1RAP, либо с изотипическим контролем 5 (насыщающая доза) в течение 30 мин перед стимуляцией комбинацией IL-1 α , IL-1 β , IL-12, IL-33, IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ в конечном объеме 0,6 мл.

После 24 ч инкубации при 37 °C, 5% CO₂ собирали супернатанты. Выработку различных цитокинов и

- хемокинов в культуральных супернатантах измеряли с применением Luminesx и различных наборов ProcartaPlex (ThermoFisher Scientific, 21-плексный набор), следуя инструкциям производителей. Проводили статистический анализ данных, полученных в 8 отдельных экспериментах для 26 доноров. Разности между показателями кандидата 1 к человеческому IL-1RAP и изотипического контроля 5
- 5 рассчитали отдельно для каждого донора и каждого анализа для объединения всех данных, затем проводили анализ с применением критерия для средних значений (t-критерия). В этом случае H_0 , или нулевая гипотеза, состояла в том, что «среднее значение разностей равно 0». Если p-значение для t-критерия ниже 0,05, H_0 отвергается, что означает наличие статистически значимого различия с изотипическим контролем 5.
- 10 Результаты, представленные на Фиг. 9, показывают, что кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует высвобождение большинства цитокинов и хемокинов статистически значимо по сравнению с изотипическим контролем 5.

4.6 Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует активацию нейтрофилов при инкубации с кондиционированной клетками HaCaT средой после стимуляции IL-1 β и IL-36 γ

- 15 Члены семейства цитокина IL-1 участвуют в ключевых воспалительных процессах, связанных с патофизиологией заболеваний (Migliorini et al., 2020)). Чтобы дополнительно определить свойства кандидата 1 к человеческому IL-1RAP, были проведены анализы *in vitro* для оценки его потенциальной способности ингибировать взаимное влияние клеток — нейтрофилов и клеток кожи.

- 20 Нейтрофилы были выделены из свежеполученной человеческой крови от здоровых доноров (в пробирках с ЭДТА) с применением набора для выделения человеческих нейтрофилов EasySep Direct Human Neutrophil Isolation kit (Stemcell, 19666) в соответствии с инструкциями производителей.

Чистоту выделенных нейтрофилов оценивали проточной цитометрией с применением CD15 в качестве специфического маркера нейтрофилов.

- 25 Кондиционированную клетками HaCaT среду получали инкубацией клеток HaCaT в среде с кандидатом 1 к человеческому IL-1RAP или изотипическим контролем 5 (насыщающая доза) в течение 30 мин при 37 °C, 5% CO₂. В конце инкубации в соответствующие лунки добавляли простую среду либо комбинацию человеческих цитокинов IL-1 β и IL-36 γ (оба получены от R&D Systems). После 24 ч инкубации при 37 °C, 5% CO₂ супернатанты переносили на 96-луночный глубокий планшет и хранили в морозильной камере при -80 °C до проведения количественного определения цитокинов/хемокинов. Выработку IL-8, MCP-1, GRO-30 а в культуральных супернатантах измеряли с применением Luminesx и наборов ProcartaPlex (ThermoFisher Scientific, EPX01A-10204-901, EPX01B-10281-901 и EPX01A-12122-901), следуя инструкциям производителей.

- 35 Сразу после выделения человеческие нейтрофилы инкубировали с этой предварительно полученной кондиционированной средой в течение 3 ч при 37 °C, 5% CO₂. После инкубации клетки собирали и окрашивали в течение 20 минут мечеными антителами к различным поверхностным маркерам CD45,

CD15, CD66b, CD62L, CD11b, CD54 (ThermoFisher Scientific).

После 3 ч инкубации активированные нейтрофилы характеризовались следующим фенотипом: CD45⁺CD15⁺CD66b⁺CD54⁺CD62L⁻. С помощью описанного выше способа рассчитывали индекс стимуляции и процентную долю ингибирования для каждого донора нейтрофилов.

$$SI (\text{проба}) = \frac{\% \text{ активных нейтрофилов}_{\text{проба}}}{\text{Среднее } (\% \text{ активных нейтрофилов}_{\text{только клетки NaCaT}})}$$

% ингибирования (проба)

$$= \frac{SI_{\text{проба}} - \text{Среднее } (SI)_{\text{только клетки NaCaT}}}{\text{Среднее } (SI)_{\text{NaCaT, стимулированные комбинацией цитокинов}} - \text{Среднее } (SI)_{\text{только клетки NaCaT}}}$$

5

Разности между показателями кандидата 1 к человеческому IL-1RAP и изотипического контроля 5 рассчитывали отдельно для каждого донора для объединения всех данных, затем проводили анализ с применением критерия для средних значений (t-критерия). В этом случае H_0 , или нулевая гипотеза, состояла в том, что «среднее значение разностей равно 0». Если р-значение для t-критерия ниже 0,05, H_0 отвергается, что означает наличие статистически значимого различия с изотипическим контролем 5.

10

Результаты, представленные на Фиг. 10, показывают, что кандидат 1 к человеческому IL-1RAP ингибирует активацию нейтрофилов, опосредуемую хемокинами, высвобожденными стимулированными клетками NaCaT, по сравнению с изотипическим контролем 5.

Пример 5. Определение биологических характеристик in vitro кандидата 1 к мышинному IL-1RAP

5.1.1 Кандидат 1 к мышинному IL-1RAP специфически связывается с мышинным IL-1RAP

15

Связывание кандидата 1 к мышинному IL-1RAP (содержащего области CDR тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 265, 266, 267 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 74) с мембраносвязанным мышинным IL-1RAP оценивали проточной цитометрией с применением соответствующей клеточной линии, такой как клеточная линия мышинных фибробластов NIH-3T3 (ATCC, CRL-1658).

20

Вкратце, клетки собирали, подсчитывали и высевали на 96-луночный круглодонный планшет по 50 000 клеток/луночка. Планшет центрифугировали при 350g в течение 3 минут и ресуспендировали клетки в 50 мкл буфера для FACS (PBS (1 ×) + 2,5% FCS + 2 mM ЭДТА + 0,05% NaN₃), содержащего различные концентрации (в диапазоне от 20 до 0,0001 мкг/мл) либо кандидата 1 к мышинному IL-1RAP, либо антител изотипического контроля 2. Окрашенные клетки инкубировали в течение 30 минут при 4 °C, дважды промывали буфером для FACS при 350g в течение 3 мин и ресуспендировали в 100 мкл моноклонального второго антитела к мышинному IgG PE-Сyanine7 (Biolegend, 407114), разбавленного 1 : 200 в буфере для FACS. Затем клетки дважды промывали и ресуспендировали в 200 мкл буфера для FACS, содержащего краситель для окрашивания мертвых клеток SYTOX Green (ThermoFisher Scientific, S34860), и вносили пробы в прибор CytoFlex (Beckman Coulter). Клетки гейтировали по размеру на двумерных гистограммах

25

30

FSC/SSC и анализировали геометрические средние (геом. ср.) интенсивности флуоресценции PE-Cyaneine7 с применением программного обеспечения FlowJo. Наконец, рассчитали относительные геом. ср. интенсивности флуоресценции путем вычитания флуоресценции кандидата 1 к мышинному IL-1RAP из флуоресценции антител изотипического контроля 2. Как изображено на Фиг. 11, кандидат 1 к мышинному IL-1RAP распознает мембраносвязанный IL-1RAP, экспрессируемый на клетках линии NIH-3T3. Проводили множество независимых экспериментов. Сводная информация по соответствующим значениям K_D представлена в таблице 9.

Таблица 9. Кандидат 1 к мышинному IL-1RAP специфически связывается с мышинным IL-1RAP

Тип клеток	N	$KD \pm SD$ (нМ)
NIH-3T3	2	$1,15 \pm 1,53$

В таблице приведены значения KD , определенные по данным экспериментов с применением проточной цитометрии, в которых кандидата 1 к мышинному IL-1RAP (●) или изотипический контроль 2 (■) (Фиг. 11) инкубировали с клетками линии NIH-3T3. Значения KD были получены с применением функции нелинейной сигмоидальной регрессии. В сводную таблицу были включены кривые, демонстрирующие достаточно хорошее соответствие модели ($R^2 > 0,7$).

5.1.2 Кандидат 1 к мышинному IL-1RAP ингибирует высвобождение цитокинов, индуцируемое как IL-33, так и IL-36, в анализе стимуляции клеток NIH-3T3

Способность кандидата 1 к мышинному IL-1RAP ингибировать пути IL-1, IL-33 и IL-36 изучали на клеточной линии мышинных фибробластов NIH-3T3 (ATCC, CRL-1658) с применением способа, описанного выше для клеточной линии HaCaT.

Вкратце, клетки собирали, подсчитывали и ресуспендировали до концентрации $0,05 \times 10^6$ клеток/мл в полной среде DMEM (DMEM + 10% FBS + 1% глутамин + 1% пенициллин/стрептомицин + 1% NEPES + 0,1% β -меркаптоэтанол). По сто мкл клеток распределяли в 96-луночном плоскодонном планшете и инкубировали при 37 °C, 5% CO₂ в течение 16 ч. На следующий день клетки инкубировали с 50 мкл либо кандидата 1 к мышинному IL-1RAP (диапазон от 50 до 0,000005 мкг/мл), либо изотипического контроля 2 (одна доза 50 мкг/мл) в виде серии разведений в среде для анализа (полная среда DMEM) в течение 30 минут. В конце инкубации в соответствующие лунки вносили по 50 мкл либо мышинного IL-1 β , либо человеческого IL-33, либо комбинации мышинных IL-36 α , β или γ (все получены от Peprotech, кроме цитокинов mIL-36: R&D Systems). После периода времени от 24 ч до 48 ч инкубации при 37 °C, 5% CO₂ 100 мкл супернатантов переносили на 96-луночный круглодонный планшет и хранили в морозильной камере при -80 °C до проведения количественного определения цитокинов/хемокинов. Выработку IL-6 и CXCL-1/GRO- α в культуральных супернатантах измеряли с применением Luminex и наборов ProcartaPlex (ThermoFisher Scientific, PX01A-20603-901 и EPX01A-2603 1-901), следуя инструкциям производителей.

Как изображено на Фиг. 12, кандидат 1 к мышинному IL-1RAP ингибирует высвобождение как цитокина IL-6, так и хемокина CXCL-1/GRO- α при стимуляции клеток NIH-3T3 мышинным IL-1 β , человеческим IL-

33 или мышинными IL-36. Влияние кандидата 1 к мышинному IL-1RAP на мышинный IL-1 β очень слабое, так как эти клетки менее чувствительны к стимуляции мышиным IL-1 β , что делает диапазон стимуляции очень малым. Этот эффект является дозозависимым для путей IL-33 и IL-36. Во всех анализах были установлены и применены критерии включения, чтобы обеспечить достаточный диапазон стимуляции или индекс стимуляции (SI) для определения процентной доли ингибирования.

Проводили множество экспериментов с вариантами Fc-части кандидата 1 к мышинному IL-1RAP, последний эксперимент согласовывался с предшествующими результатами, он приведен на Фиг. 12, а значения EC₅₀ ингибирования в сводном виде указаны в таблице 10.

Таблица 10. Кандидат 1 к мышинному IL-1RAP ингибирует высвобождение цитокинов, индуцируемое как IL-33, так и IL-36, в анализе стимуляции клеток NIH-3T3.

Стимулятор	Считываемое показание	EC50 (нМ)	Макс. ингибирование (%)
mIL-1b	mIL-6	3,14	47,1
hIL-33	mIL-6	1,02	103,6
mIL-36	mCXCL-1	1,68	108,1

В таблице показаны значения EC₅₀ и максимального ингибирования, определенные в анализе стимуляции, в котором кандидата 1 к мышинному IL-1RAP (●) или изотипический контроль 2 (■) (Фиг. 12) инкубировали с клетками NIH-3T3, стимулированными mIL-1 β , hIL-33 или разными mIL-36. Значения EC_x были получены с применением функции нелинейной сигмоидальной регрессии. В сводную таблицу были включены данные экспериментов в условиях достаточной стимуляции (индекс стимуляции > 1,8) и кривые, демонстрирующие достаточно хорошее соответствие модели (R² > 0,7).

Пример 6. Эффективность кандидата 1 к мышинному IL-1RAP *in vivo* в мышинной модели индуцированного острого воспаления

20 Материалы и методы

Содержание животных

Эксперименты *in vivo* проводили на 6–7-недельных самках иммунокомпетентных мышей линии C57BL/6JRj от компании JANVIER LABS. Все мыши содержались при стандартизированных условиях окружающей среды в клетках для грызунов (комнатная температура 20 ± 1 °C, относительная влажность 50 ± 10%, 12-часовой цикл света и темноты). Мыши получали облученные пищу и подстилку и питьевую воду, профильтрованную через фильтр с порами 0,22 мкм.

Мышиная модель индуцированного острого воспаления *in vivo*

Проводили два эксперимента, получивших названия «исследование Bely_4» и «исследование Bely_5» соответственно.

Исследование Bely_4. Мышам линии C57BL/6JRj вводили интраперитонеально различные препараты в день 0. Через два часа после введения препаратов мышам вводили интраперитонеально смесь интерлейкинов (мышинный IL-1 бета, человеческий IL-33 и мышинный IL-36 альфа, бета и гамма). Через 24 ч после первого введения препаратов проводили эвтаназию мышей. Мышиную сыворотку крови, спленоциты и внутрибрюшинный смыв собирали для анализа *ex vivo*. Мышиную сыворотку исследовали на Lumindex. Спленоциты и внутрибрюшинный смыв анализировали методом FACS.

Исследование Bely_5. Мышам линии C57BL/6JRj вводили интраперитонеально различные препараты в день 0, день 1 и день 2. Через два часа после введения препаратов мышам вводили интраперитонеально смесь интерлейкинов (мышинный IL-1 бета, человеческий IL-33 и мышинный IL-36 альфа, бета и гамма). Через 24 ч и/или 72 ч после первого введения препаратов проводили эвтаназию мышей. Мышиную сыворотку крови, спленоциты и внутрибрюшинный смыв собирали для анализа *ex vivo*. Мышиную сыворотку исследовали на Lumindex. Спленоциты и внутрибрюшинный смыв анализировали методом FACS.

Получение мышинных проб для проточной цитометрии

Для получения спленоцитов селезенки собирали и проводили механическую дезинтеграцию. Суспензии клеток фильтровали и центрифугировали. После этого клетки подсчитывали и окрашивали для определения профиля иммунных клеток. Окрашивание с полным набором антител и относительные контроли получали в буфере для FACS. Пробы анализировали на приборе Northern Lights (CYTEK). Данные проанализировали с применением Kaluza и GraphPad Prism 8.

Для получения внутрибрюшинного смыва в брюшную полость вводили PBS. Осторожно массировали брюшную стенку для отделения клеток и затем собирали жидкость формированием разреза в брюшной стенке. Суспензии клеток фильтровали и центрифугировали. После этого клетки подсчитывали и окрашивали для определения профиля иммунных клеток. Окрашивание с полным набором антител и относительные контроли получали в буфере для FACS. Пробы анализировали на приборе Northern Lights (CYTEK). Данные проанализировали с применением Kaluza и GraphPad Prism 8.

Получение мышинных проб для анализа Lumindex.

Пробы сыворотки крови количественно оценивали методом Multiplex Lumindex, следуя инструкциям производителя. Гранулы, пробы *in vivo* и/или супернатанты и разбавленные стандарты, поставляемые в наборе, добавляли на планшеты и инкубировали в течение ночи. Затем на планшеты добавляли детекторное антитело и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали, добавляли стрептавидин-фикоэритрин (стрептавидин-PE) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали, добавляли буфер считывания и инкубировали при комнатной температуре перед снятием показаний на приборе Lumindex 200. Анализ данных Lumindex проводили с применением программного обеспечения ProcartaPlex 1.0 Analyst. Концентрации цитокинов нормировали относительно верхнего (ВПКО) и нижнего (НПКО) пределов количественного определения. Всем данным ниже НПКО придавали значения самой нижней точки стандартных кривых и их считали не

подающимися анализу (при анализе с GraphPad Prism нулевое значение данных недопустимо). Данные проанализировали с применением Excel и GraphPad Prism 8.

Статистический анализ

5 Данные анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism 8. Проводили статистический анализ: односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим множественным сравнением с использованием критерия Даннета. Значение $p < 0,05$ считалось признаком статистической значимости. Уровень значимости указан звездочками. (**** для $< 0,0001$; *** для $0,0001$; ** для $0,001$ и * для $0,01$).

Результаты и выводы

10 Эффективность кандидата 1 к мышинному IL-1RAP (содержащего SEQ ID NO: 73 и SEQ ID NO: 74) изучали в двух независимых экспериментах на мышинной модели индуцированного острого воспаления *in vivo*. Мышам линии C57BL/6JRj вводили внутрибрюшинно различные препараты в день 0 в первом исследовании и в день 0, день 1 и день 2 во втором исследовании. Через два часа после введения каждого препарата мышам вводили внутрибрюшинно смесь интерлейкинов (мышинный IL-1 бета, человеческий IL-15
15 33 и мышинный IL-36 альфа, бета и гамма). Через 24 ч после первой инъекции препаратов в первом исследовании и через 72 ч после первой инъекции препаратов во втором исследовании мышей подвергали эвтаназии. Мышиную сыворотку крови, спленоциты и внутрибрюшинный смыв собирали для анализа *ex vivo*.

Через 24 ч после первой инъекции кандидат 1 к мышинному IL-1RAP показал значимое снижение уровня
20 IL-5 (Фиг. 1F) по сравнению с контрольной группой (p -значение = $0,0018$). Значимого снижения уровней IL-5, вызванного стандартами — анакирой (p -значение = $0,1611$) и mIL36Ra (p -значение = $0,4719$), не наблюдалось.

Критерий Даннета для множественных сравнений	Средняя разн.	95,00% ДИ разн.	Значимая?	Обобщение	Скорректированное р-значение
Мыши, получившие IL, в сравнении с мышами без обработки	317,4	от 126,1 до 508,6	Да	***	0,0006
Мыши, получившие IL, в сравнении с изотипическим контролем 1	44,69	от -146,5 до 235,9	Нет	н.з.	0,97
Мыши, получившие IL, в сравнении с кандидатом 1 к мышинному IL-1RAP	285,5	от 94,24 до 476,7	Да	**	0,0018
Мыши, получившие IL, в сравнении с анакирой (антагонист рецептора IL-1)	-151,6	от -342,8 до 39,61	Нет	н.з.	0,1611
Мыши, получившие IL, в сравнении с mIL36Ra (mIL1F5)	106,1	от -85,13 до 297,3	Нет	н.з.	0,4719

Таблица 11. Статистический анализ данных с Фиг. 13

Через 72 ч после первой инъекции кандидат 1 к мышинному IL-1RAP показал значимое снижение уровня

IL-5 (Фиг. 14) и Gro-альфа (Фиг. 3) по сравнению с контрольной группой (p-значение = 0,0356 и p-значение = 0,0009 соответственно). Значимого снижения уровней IL-5, вызванного стандартами — анакинрой (p-значение = 0,5413) и mIL36Ra (p-значение = 0,1337), не наблюдалось. Значимое снижение уровня Gro-альфа индуцировала анакинра (p-значение = 0,0162), но не mIL36Ra (p-значение = 0,933).

Критерий Даннета для множественных сравнений	Средняя разн.	95,00% ДИ разн.	Значимая?	Обобщение	Скорректированное p-значение
Мыши, получившие IL, в сравнении с мышами без обработки	317,4	от 17,36 до 617,3	Да	*	0,0356
Мыши, получившие IL, в сравнении с изотипическим контролем I	235,5	от -64,48 до 535,5	Нет	н.з.	0,1589
Мыши, получившие IL, в сравнении с кандидатом I к мышиному IL-1RAP	317,4	от 17,36 до 617,3	Да	*	0,0356
Мыши, получившие IL, в сравнении с анакинрой (антагонист рецептора IL-1)	-148,2	от -448,2 до 151,8	Нет	н.з.	0,5413
Мыши, получившие IL, в сравнении с mIL36Ra (mIL1F5)	245,8	от -54,19 до 545,8	Нет	н.з.	0,1337

5 Таблица 12. Статистический анализ данных с Фиг. 14

Критерий Даннета для множественных сравнений	Средняя разн.	95,00% ДИ разн.	Значимая?	Обобщение	Скорректированное p-значение
Мыши, получившие IL, в сравнении с мышами без обработки	18,25	от 7,852 до 28,65	Да	***	0,0003
Мыши, получившие IL, в сравнении с изотипическим контролем I	-4 666	от -15,06 до 5,731	Нет	н.з.	0,6704
Мыши, получившие IL, в сравнении с кандидатом I к мышиному IL-1RAP	16,64	от 6,242 до 27,04	Да	***	0,0009
Мыши, получившие IL, в сравнении с анакинрой (антагонист рецептора IL-1)	12,24	от 1,845 до 22,64	Да	*	0,0162
Мыши, получившие IL, в сравнении с mIL36Ra (mIL1F5)	2,92	от -7,477 до 13,32	Нет	н.з.	0 933

Таблица 13. Статистический анализ данных с Фиг. 15

Кандидат I к мышиному IL-1RAP ингибирует высвобождение IL-5 в мышинной сыворотке крови через 24 ч и 72 ч после инъекции интерлейкинов и ингибирует высвобождение Gro-альфа в мышинной сыворотке через 72 ч после инъекции интерлейкинов. Эти данные подтвердили, что по сравнению со стандартами нацеливание на IL-1RAP позволяло блокировать сигнальные пути IL-36, IL-33 и IL1 *in vivo*.

10

Пример 7. Эффективность кандидата I к мышиному IL-1RAP *in vivo* в мышинной модели индуцированного хронического воспаления

Материал и способ

Содержание животных

Эксперименты *in vivo* проводили на 8–9-недельных самках иммунокомпетентных мышей линии C57BL/6J (JR №00664), инбридной линии, созданной компанией Jackson Laboratories (г. Бар-Харбор, штат Мэн, США). Все мыши содержались при стандартизованных условиях окружающей среды в клетках для грызунов (комнатная температура 20 ± 1 °C, относительная влажность $50 \pm 10\%$, 12-часовой цикл света и темноты). Мыши получали облученные пищу и подстилку и питьевую воду, профильтрованную через фильтр с порами 0,22 мкм.

Псориазоподобные мышинные модели

Прижизненные наблюдения и процедуры. Мышей взвешивали три дня до начала исследования и в течение всей прижизненной фазы. Мышам сбрасывали шерсть за 48 часов до нанесения IMQ. На спину и оба уха мышей со сбритой шерстью ежедневно наносили местно 5% крем IMQ (Aldara®). На обработанные IMQ участки кожи накладывали стерильную непрозрачную повязку Tegaderm™ для защиты нанесенного местно крема. Введение мышам препаратов внутривентральным путем введения осуществляли раз в три дня в случае всех молекул, кроме анакинры, которую вводили внутривентральным путем введения ежедневно. Ежедневно проводили физикальное обследование мышей и определяли оценку PASI (индекс площади поверхности псориаза и степени тяжести) следующим образом: эритема (раздражение/покраснение кожи) и образование струпуев (1–4 балла) / образование псориазических чешуек и шкала степени тяжести поражения (1–4 балла). В конце исследования собирали кожу спины для анализа *ex vivo*. Проводили гистологическое исследование кожи спины.

20 Получение мышинных проб для экспериментов *ex vivo*

Левую сторону кожи спины нарезали на полоски шириной 1 см (поперечное сечение) перед фиксацией в 4% формалине.

Гистологические анализы

25 Кожу спины (4 пробы на микроскопический препарат) окрашивали гематоксилином. Анализ микроскопических препаратов проводили с помощью программного обеспечения cellSens Standard. Количественную оценку образования эпидермальных тяжей (называемого акантозом) проводили на 4 пробах кожи на микроскопический препарат на мышшь/10 изображений на микроскопический препарат/6 мышей на группу. Проводили двойную оценку. Данные проанализировали с применением Excel и GraphPad Prism 8.

30 Статистический анализ

Данные анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism 8. Проводили статистический анализ: односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим множественным сравнением с использованием критерия Даннета для множественных сравнений. Значение $p < 0,05$ считалось признаком статистической значимости. Уровень значимости указан

звездочками (**** для $< 0,0001$; *** для $0,0001$; ** для $0,001$ и * для $0,01$).

Результаты и выводы

Псориаз представляет собой воспалительное заболевание кожи с ускоренным обновлением эпидермальных клеток. Циркулирующие в кровотоке нейтрофилы мигрируют к псориазическим очагам и индуцируют респираторный взрыв, дегрануляцию и образование нейтрофильной внеклеточной ловушки, внося таким образом вклад в иммунопатогенез псориаза, куда вовлечены нарушение баланса Т-клеток, пролиферация кератиноцитов, ангиогенез и образование аутоантигенов. Накопление нейтрофилов в коже — одна из гистологических характеристик псориаза. IL-36, вырабатываемый и секретируемый на высоком уровне, играет ключевую роль в псориазоподобном заболевании кожи, индуцированном имиквимодом. IL-36 может способствовать привлечению нейтрофилов. IL-36 и IL-1 совместно стимулируют псориазоподобное воспаление кожи посредством взаимной регуляции. Эффективность кандидата 1 к мышинному IL-1RAP изучали *in vivo* в мышинной модели индуцированного хронического воспаления: Мышиная модель псориазоподобного воспаления кожи.

На спину и оба уха мышей со сбритой шерстью ежедневно наносили местно 5% крем IMQ (Aldara®). На обработанные IMQ участки кожи накладывали стерильную непрозрачную повязку Tegaderm™ для защиты нанесенного местно крема. Введение мышам препаратов внутрибрюшинным путем введения осуществляли раз в три дня в случае всех молекул, кроме анакинры, которую вводили внутрибрюшинным путем введения ежедневно. Ежедневно проводили физикальное обследование мышей и определяли оценку PASI (индекс площади поверхности псориаза и степени тяжести) следующим образом: эритема (раздражение/покраснение кожи) и образование струпуев (1–4 балла) / образование псориазических чешуек и шкала степени тяжести поражения (1–4 балла).

В день 10 кандидат 1 к мышинному IL-1RAP индуцировал значимое снижение образования псориазических чешуек и оценки поражения (p -значение = $0,0141$ при 1 мг и p -значение = $0,0025$ при 250 мкг) в модели псориазоподобного воспаления кожи (Фиг. 16) по сравнению с контрольной группой.

Критерий Даннета для множественных сравнений	Средняя разн.	95,00% ДИ разн.	Значимая?	Обобщение	Скорректированное р-значение
Мыши, получившие IMQ + PBS, в сравнении с мышами без обработки	2,667	от 1,811 до 3,522	Да	****	$< 0,0001$
Мыши, получившие IMQ + PBS, в сравнении с изотипическим контролем 3 при 1 мг	1	от 0,3015 до 1,699	Да	**	0,0025
Мыши, получившие IMQ + PBS, в сравнении с кандидатом 1 к мышинному IL-1RAP при 1 мг	0,8333	от 0,1348 до 1,532	Да	*	0,0141
Мыши, получившие IMQ + PBS, в сравнении с кандидатом 1 к мышинному IL-1RAP при 250 мкг	1	от 0,3015 до 1,699	Да	**	0,0025
Мыши, получившие IMQ + PBS, в сравнении с	0,6667	от -0,03187 до 1,365	Нет	н.з.	0,0661

анакиной (антагонист рецептора IL-1)					
Мыши, получившие IMQ + PBS, в сравнении с mL36Ra (mL1F5)	0,1667	от -0,5319 до 0,8652	Нет	н.з.	0,9704

Таблица 14. Статистический анализ данных с Фиг. 16

Гистологические данные продемонстрировали, что кандидат 1 к мышному IL-1RAP может ингибировать образование эпидермальных тяжей (р-значение = 0,0001), также называемых *акантозом*, в модели псориазоподобного воспаления кожи (Фиг. 17 и 18) по сравнению с контрольной группой и группой изотипического контроля. Значимое снижение образования акантоза наблюдалось с mL36Ra (р-значение = 0,0006), но не с анакиной (р-значение = 0,0702).

Изображения по результатам гистологического исследования проб кожи спины мышей приведены на Фиг. 18. Вкратце, мышам вводили имиквимод и PBS (А), изотипический контроль 3 (В), кандидат 1 к мышному IL-1RAP в дозе 1 мг (С), кандидат 1 к мышному IL-1RAP в дозе 250 мкг (D), анакину (Е), mL36Ra (F) или не вводили препараты (G). Введение кандидата 1 к мышному IL-1RAP ингибировало инфильтрацию нейтрофилами в мышной модели псориазоподобного воспаления кожи.

Данные исследования IMQ_s2.

Критерий Даннега для множественных сравнений	Средняя разн.	95,00% ДИ разн.	Значимая?	Обобщение	Скорректированное р-значение
Мыши, получившие IMQ + PBS, в сравнении с мышами без обработки	10,97	от 5,411 до 16,52	Да	****	< 0,0001
Мыши, получившие IMQ + PBS, в сравнении с изотипическим контролем 3 при 1 мг	5,6	от 1,064 до 10,14	Да	*	0,0106
Мыши, получившие IMQ + PBS, в сравнении с кандидатом 1 к мышному IL-1RAP при 1 мг	8,283	от 3,747 до 12,82	Да	***	0,0001
Мыши, получившие IMQ + PBS, в сравнении с кандидатом 1 к мышному IL-1RAP при 250 мкг	6,467	от 1,930 до 11,00	Да	**	0,0027
Мыши, получившие IMQ + PBS, в сравнении с анакиной (антагонист рецептора IL-1)	4,283	от -0,2530 до 8,820	Нет	н.з.	0,0702
Мыши, получившие IMQ + PBS, в сравнении с mL36Ra (mL1F5)	7,4	от 2,864 до 11,94	Да	***	0,0006

Таблица 15. Статистический анализ данных с Фиг. 17

Кандидат 1 к мышному IL-1RAP ингибирует инфильтрацию нейтрофилами в мышной модели псориазоподобного воспаления кожи. Эти данные подтвердили, что по сравнению со стандартами нацеливание на IL-1RAP позволяло блокировать сигнальные пути IL-36, IL-33 и IL1 *in vivo*.

Пример 8. Определение биологических характеристик *in vitro* кандидата 1 к человеческому IL-1RAP

Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP дозозависимым образом ингибирует высвобождение цитокинов в анализе повторной стимуляции в цельной крови при стимуляции IL-1.

- 5 Хотя предшествующие анализы позволили оценить способность кандидата 1 к человеческому IL-1RAP ингибировать объединенные пути, опосредуемые IL-1RAP, в контексте анализа цельной крови, в данном случае применяли отдельно IL-1 α или IL-1 β , чтобы оценить способность кандидата 1 к человеческому IL-1RAP ингибировать стимулируемые IL-1 пути и определить полумаксимальную эффективную концентрацию (или EC₅₀) ингибирования.

10 Материалы и методы

- Свежеполученную человеческую кровь от здоровых доноров (в цитратных пробирках) распределяли по пробиркам вместимостью 15 мл и проводили предварительную инкубацию либо только со средой (RPMI), либо с серийными разведениями кандидата 1 к человеческому IL-1RAP в диапазоне от 25 мкг/мл до 0,00032 мкг/мл, либо с изотипическим контролем 4 (25 мкг/мл) в течение 30 мин перед стимуляцией 15 5 нг/мл IL-1 α или 5 нг/мл IL-1 β в конечном объеме 0,6 мл. После 24 ч инкубации при 37 °C, 5% CO₂ собирали супернатанты. Выработку различных цитокинов и хемокинов в культуральных супернатантах измеряли с применением Luminex и мультиплексного набора ProcartaPlex (ThermoFisher Scientific, 9-плексный набор), следуя инструкциям производителей. Данные количественного определения аналитов нормализовали относительно индекса стимуляции:

- 20 Индекс стимуляции (проба), [SI] _X = ([Высвобождение цитокина] _X (Проба))/([Среднее высвобождение цитокина] _X (Кровь без стимуляции))

Данные с индексом стимуляции (кровь со стимуляцией/кровь без стимуляции) ниже 3 (3-кратный относительно исходного уровня) исключали из данных для определения процентной доли ингибирования.

- 25 % Ингибирования (Проба) = (1 - ([SI] _X (Проба) - [SI] _X Среднее (Кровь без стимуляции))/([Средний SI] _X (Со стимуляцией) - [Средний SI] _X (Кровь без стимуляции))) x 100,

где X представляет собой изучаемый цитокин/хемокин, «со стимуляцией» соответствует значениям, полученным для цельной крови после предварительной инкубации с изотипическим контролем и затем с цитокином X, а «кровь без стимуляции» соответствует значениям, полученным для цельной крови без какой-либо стимуляции. Каждый расчет специфичен в отношении донора и цитокина.

- 30 Значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) были получены с применением функции нелинейной сигмоидальной регрессии. В сводную таблицу были включены данные экспериментов в условиях достаточной стимуляции (индекс стимуляции > 3) и кривые, демонстрирующие достаточно хорошее соответствие модели (R² > 0,7 и разброс > 50%).

Проводили три независимых эксперимента суммарно с 15 донорами. В таблице В на Фиг. 18 указано количество включенных доноров, демонстрирующих условия достаточной стимуляции (индекс стимуляции > 3).

- 5 Результаты, приведенные на Фиг. 18 и в таблице 16, показывают, что кандидат 1 к человеческому IL-1RAP демонстрирует зависимое от концентрации ингибирование высвобождения IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α и MIP-1 β после стимуляции IL-1 α или IL-1 β в анализе повторной стимуляции в цельной крови со средним значением EC₅₀, находящимся в наномолярном диапазоне, как в случае IL-1 α , так и в случае IL-1 β .

СТИМУЛЯЦИЯ	СЧИТЫВАЕМОЕ ПОКАЗАНИЕ	№ включенных доноров	Средняя EC ₅₀ \pm SD
IL-1alpha	IL-6	11/13	9,5 \pm 8,6 нМ
IL-1alpha	IL-8	4/11	14,2 \pm 7 нМ
IL-1alpha	MCP-1	5/10	11,1 \pm 13,5 нМ
IL-1alpha	MIP-1alpha	6/8	15 \pm 14 нМ
IL-1alpha	MIP-1beta	7/10	89 \pm 153,8 нМ
IL-1beta	IL-6	12/15	8,8 \pm 7,7 нМ
IL-1beta	IL-8	9/15	24,7 \pm 22,3 нМ
IL-1beta	MCP-1	4/10	17,7 \pm 21,1 нМ
IL-1beta	MIP-1alpha	8/10	16 \pm 23,8 нМ
IL-1beta	MIP-1beta	6/11	53,3 \pm 49,9 нМ

Таблица 16

- 10 Для определения зависимости эффекта от дозы кандидата 1 к человеческому IL-1RAP или максимальную дозу изотипического контроля 4 инкубировали в человеческой цельной крови с 5 нг/мл IL-1 α или 5 нг/мл IL-1 β .

- 15 В таблице 16 приведены EC₅₀ ингибирования для всех включенных доноров для каждого вида стимуляции и каждого считываемого показания. Значения EC_x были получены с применением функции нелинейной сигмоидальной регрессии. В сводную таблицу были включены данные экспериментов в условиях достаточной стимуляции (индекс стимуляции > 3) и кривые, демонстрирующие достаточно хорошее соответствие модели ($R^2 > 0,7$ и разброс > 50%). Проводили три независимых эксперимента суммарно с 15 донорами. В виде X/Y представлено количество доноров, у которых кандидат 1 к человеческому IL-1RAP демонстрирует ингибирование (X), из числа доноров, которые ответили на стимуляцию IL-1 (Y).

- 20 При аутоиммунных расстройствах кандидат 1 к человеческому IL-1RAP может подавлять стимулируемый IL-1 воспалительный ответ, который усиливает патогенную выработку цитокинов и делает патофизиологическое развитие заболевания более острым.

Кроме того, были получены данные с применением IL-12/IL-33 и IL-36 α /IL-36 β /IL-36 γ в качестве стимуляторов, и они продемонстрировали дозозависимую регуляцию высвобождения цитокинов и

хемокинов (данные не показаны).

Формула изобретения

1. Антитело к IL-1RAP, содержащее первую область CDR тяжелой цепи (CDR-H1), вторую область CDR тяжелой цепи (CDR-H2) и третью область CDR тяжелой цепи (CDR-H3), выбранные из группы:

5 (a) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность GFXXXXXXXX (SEQ ID NO: 265), где X в положении 3 может являться любой из аминокислот I, T, P; X в положении 4 может являться любой из аминокислот L, F, Y; X в положении 5 может являться любой из аминокислот A, S, P, E, D; X в положении 6 может являться любой из аминокислот V, G, T, H, Q, E, N, D; X в положении 7 может являться любой из аминокислот F, A, S, Y; X в положении 8 может являться любой из аминокислот A, G, S, P; X в положении 9 может являться любой из аминокислот L, M, A; X в положении 10 может являться
10 любой из аминокислот G, T, S, N;

(b) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность AISYDGEGTL (SEQ ID NO: 266);

(c) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность ARFYXXAFDY (SEQ ID NO: 267), где X в положении 4 может являться любой из аминокислот R, H; X в положении 6 может являться любой из аминокислот Y, R; X в положении 7 может являться любой из аминокислот T, S;

15 или

(d) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность GXXXXXXXXAIX (SEQ ID NO: 262), где X в положении 2 может являться любой из аминокислот V, G, S, P, E; X в положении 3 может являться любой из I, L, A, G, T, S, P, H, K, R; X в положении 4 может являться любой из L, F, A, S, W, H, N, R; X в положении 5 может являться любой из G, T, S, Y, P, H, E, N, R; X в положении 6 может являться любой из аминокислот V, A, S, P, Q, N, D; X в положении 7 может являться любой из аминокислот Y, H; X в
20 положении 10 может являться любой из аминокислот H, Q;

(e) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность YIIPXXGXXD (SEQ ID NO: 263), где X в положении 5 может являться любой из аминокислот T, S; X в положении 6 может являться любой из аминокислот V, L; X в положении 8 может являться любой из аминокислот G, Q; X в положении 9 может
25 являться любой из аминокислот F, Y;

(f) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность ARGQTLYXXGRQFDI (SEQ ID NO: 264), где X в положении 8 может являться любой из аминокислот A, E, D; X в положении 9 может являться любой из аминокислот A, T, S; и при этом указанное антитело к IL-1RAP содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 268.

30

2. Антитело по п. 1, в котором:

(a) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128;

(b) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 188;

(c) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 248.

3. Антитело по п. 1 или 2, содержащее

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

5 4. Антитело по любому из пп. 1–3, связывающееся с IL-1RAP человека с аффинностью связывания 1×10^8 М или менее, 1×10^9 М или менее, 1×10^{10} М или менее либо 1×10^{11} М или менее; причем необязательно аффинность связывания измеряют по равновесной константе диссоциации (KD) при взаимодействии с полипептидом IL-1RAP человека с SEQ ID NO: 1 или 6.

10 5. Антитело по любому из пп. 1–4, ослабляющее стимулированный IL-1 сигнал, стимулированный IL-33 сигнал и/или стимулированный IL-36 сигнал на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100%; причем ослабление сигнала измеряется с применением клеточного анализа блокировки.

6. Антитело по любому из пп. 1–6, обеспечивающее перекрестную реакцию с полипептидом IL-1RAP яванского макака с SEQ ID NO: 2.

15 7. Антитело по любому из пп. 1–6, обеспечивающее перекрестную реакцию с полипептидом IL-1RAP мыши с SEQ ID NO: 261.

8. Антитело по любому из пп. 1–7, являющееся полноразмерным антителом класса IgG, и причем, в частности, антитело класса IgG имеет изотип, выбранный из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

9. Антитело по любому из пп. 1–8, являющееся мультиспецифическим антителом.

20 10. Антитело к IL-1RAP, которое специфически связывается с тем же эпитопом, что и указанное антитело по любому из пп. 1–9.

11. Антитело к IL-1RAP, которое специфически связывается с одним или более аминокислотными остатками в домене 2 IL-1RAP.

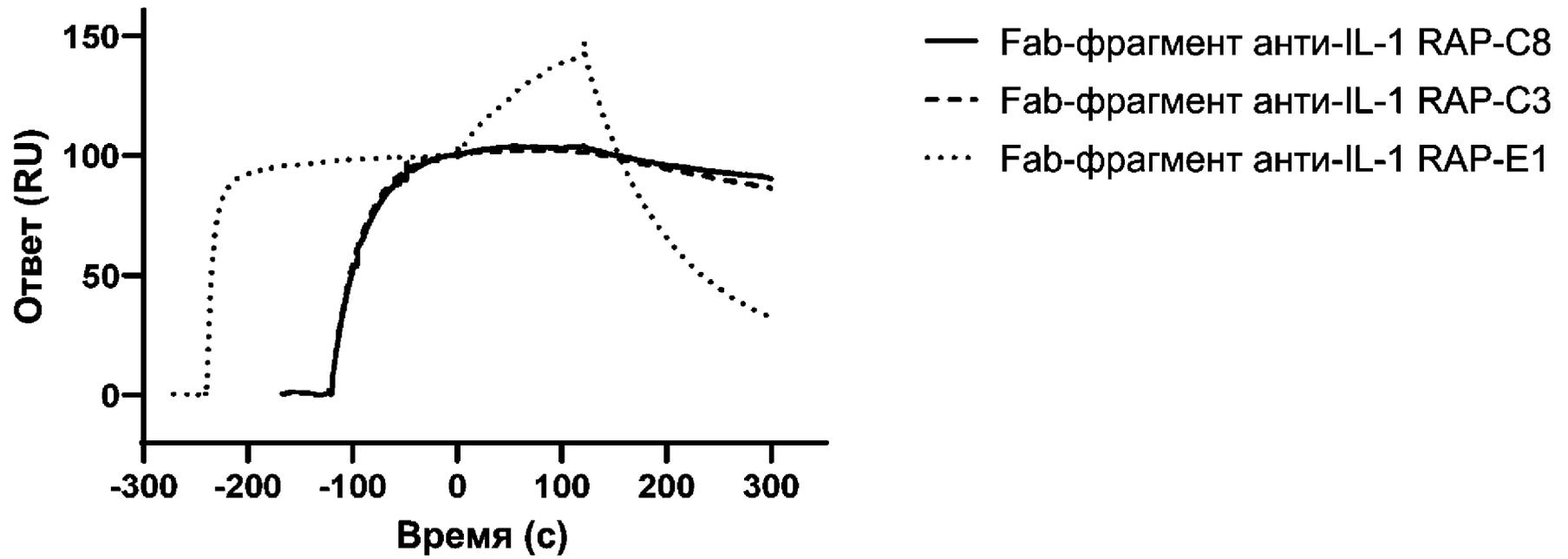
25 12. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1–9 и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Антитело по любому из пп. 1–12 для лечения IL1RAP-опосредованного заболевания.

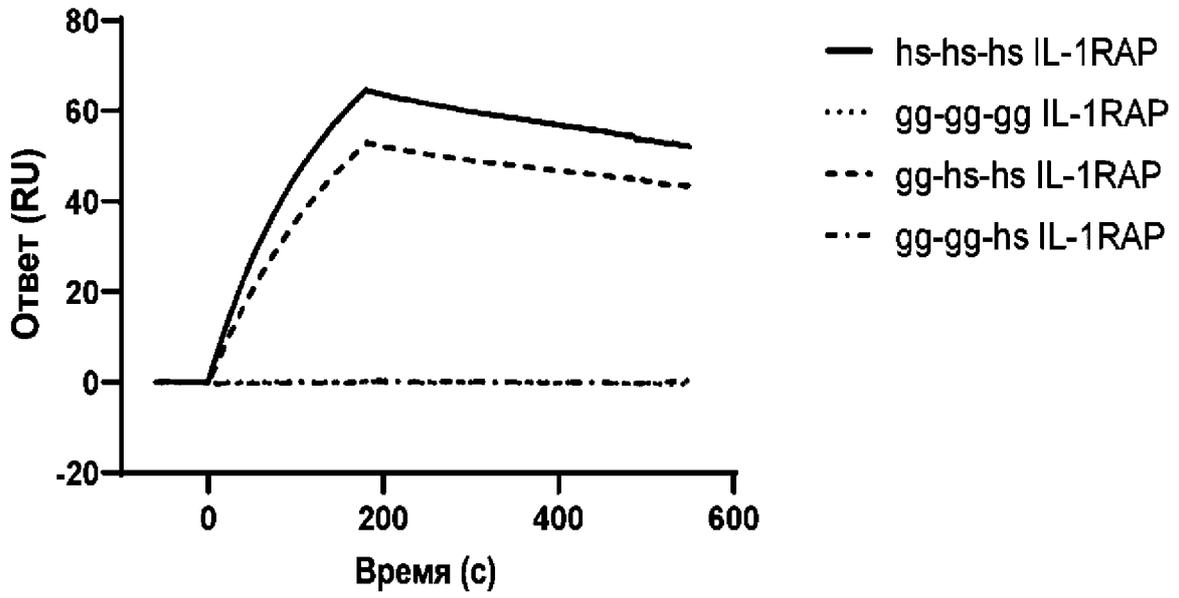
30 14. Антитело по любому из пп. 1–12 для применения в лечении заболевания, выбранного из группы, включающей: акне, панкреатит, возрастную макулярную дегенерацию (AMD), гиперчувствительность дыхательных путей, воспаление дыхательных путей, аллергический конъюнктивит, боковой амиотрофический склероз (БАС), аллергический ринит, аллергию, болезнь Альцгеймера / деменцию, боковой амиотрофический склероз (БАС), нейтрофильные дерматозы, гнойный гидраденит, ихтиоз,

анафилаксию, артрит, астму / атопию / полипы носа, атеросклероз, атопический дерматит, аутоиммунные/аутовоспалительные васкулиты (включая, без ограничений, гигантоклеточный артериит, артериит Такаясу, болезнь Кавасаки), болезнь Бехчета (включая поражение нервной системы при болезни Бехчета), рак костей, рак головного мозга, рак молочной железы, кахексию/анорексию, воспаление хряща, церебральную ишемию, синдром хронической усталости, хроническую обструктивную болезнь легких, заболевания, ассоциированные с клостридиями, колоректальный рак, застойную сердечную недостаточность, конъюнктивит, воспаление коронарных артерий, рестеноз коронарных сосудов, сахарный диабет, диабетический макулярный отек, диабетическую ретинопатию, синдром сухого глаза, эндометриоз, эозинофильное заболевание желудочно-кишечного тракта, эозинофильный эзофагит, семейный холодовой аутовоспалительный синдром, семейную средиземноморскую лихорадку, фибромиалгию, фиброзирующее заболевание, пищевую аллергию, генерализованный пустулезный псориаз, глаукому, гломерулонефрит, подагрические артриты, реакцию «трансплантат против хозяина», гельминтную инвазию, геморрагический шок, гнойный гидраденит, гипералгезию, синдром гипериммуноглобулинемии D, гиперурикемию, идиопатический легочный фиброз (IPF), боль, вызванную онкологическим заболеванием, инфекцию, воспалительное заболевание кишечника (IBD, включая, без ограничений, язвенный колит и болезнь Крона), воспалительные состояния, вызванные напряжением, воспалительное заболевание глаза, ассоциированное с трансплантацией роговицы, воспалительную боль, осложнения, связанные с гриппом, рак кишечника, ишемию, ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, рак почки, врожденный амавроз Лебера, рак печени, заболевание печени, рак легких, синдром активации макрофагов (MAS), макулярную дегенерацию, синдром Макла — Уэллса, множественную миелому, рассеянный склероз, скелетно-мышечную боль, миелогенную лейкемию и лейкемию других типов, миелодиспластические синдромы (MDS), нарушение функции миокарда, миопатии, полип носа, мультисистемное воспалительное заболевание неонатального возраста, нейротоксичность, нейтрофильные заболевания кожи (включая ладонно-подошвенный пустулез, гангренозную пиодермию, псориаз, синдром Свита), неинфекционный конъюнктивит, неинфекционный увеит, немелкоклеточный рак легких, ортопедическое хирургическое вмешательство, остеоартрит, остеопороз, боль, рак поджелудочной железы, болезнь Паркинсона, заболевание пародонта, заболевание периферических сосудов, ревматическую полимиалгию, полипозную хориоидальную васкулопатию (PCV), преэклампсию или эклампсию, преждевременные роды, рак предстательной железы, протозойную инфекцию, псориаз, псориатический артрит, гангренозную пиодермию, реперфузионное повреждение, респираторно-синцитиальный вирус (RSV), рестеноз, в частности, после ангиопластики и стентирования, отслойку сетчатки, пигментозный ретинит, ретинопатию недоношенных (ROP), ревматоидный артрит, системный склероз, эозинофильный фасцит, септический шок, серповидно-клеточную анемию, побочные эффекты лучевой терапии, синдром SAPHO (синовит, акне, пустулез, гиперостоз и остит), синусит, рак кожи, нарушение сна, воспаление, вызванное растяжением, болезнь Стилла, рак желудка, системную красную волчанку (включая волчаночный нефрит), заболевание височно-нижнечелюстного сустава, периодический синдром, ассоциированный с мутацией гена рецептора TNF, и другие генетически обусловленные лихорадочные синдромы, отторжение трансплантата, травму, травматическое повреждение глаза, сахарный диабет 2-го типа и витилиго.

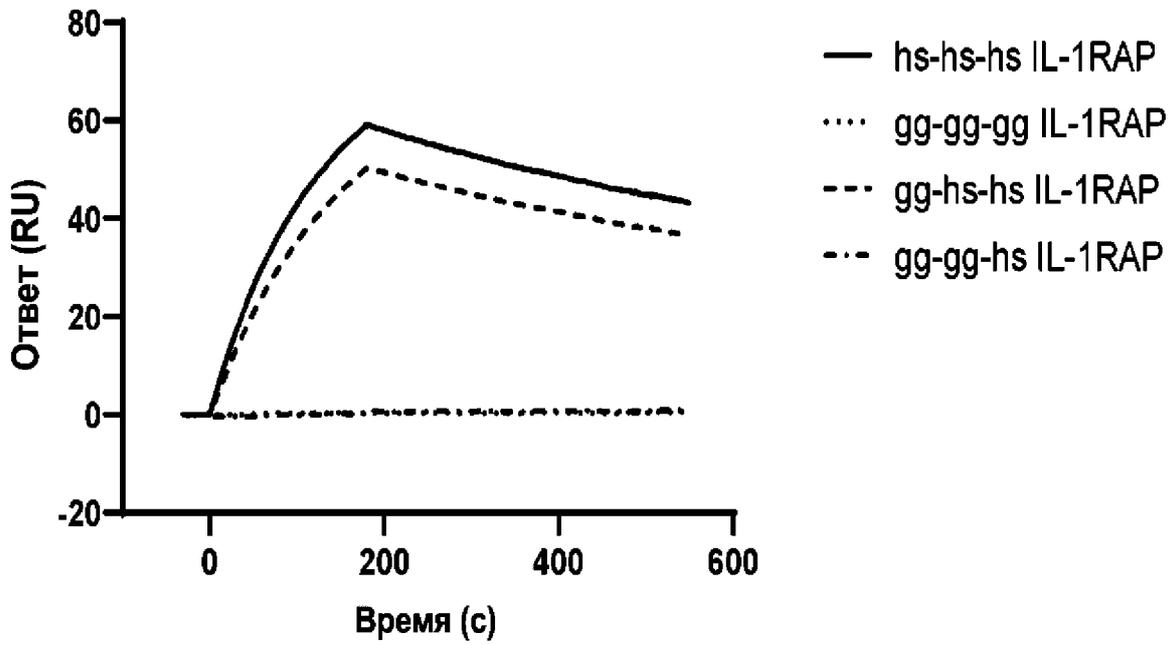
ФИГ. 1



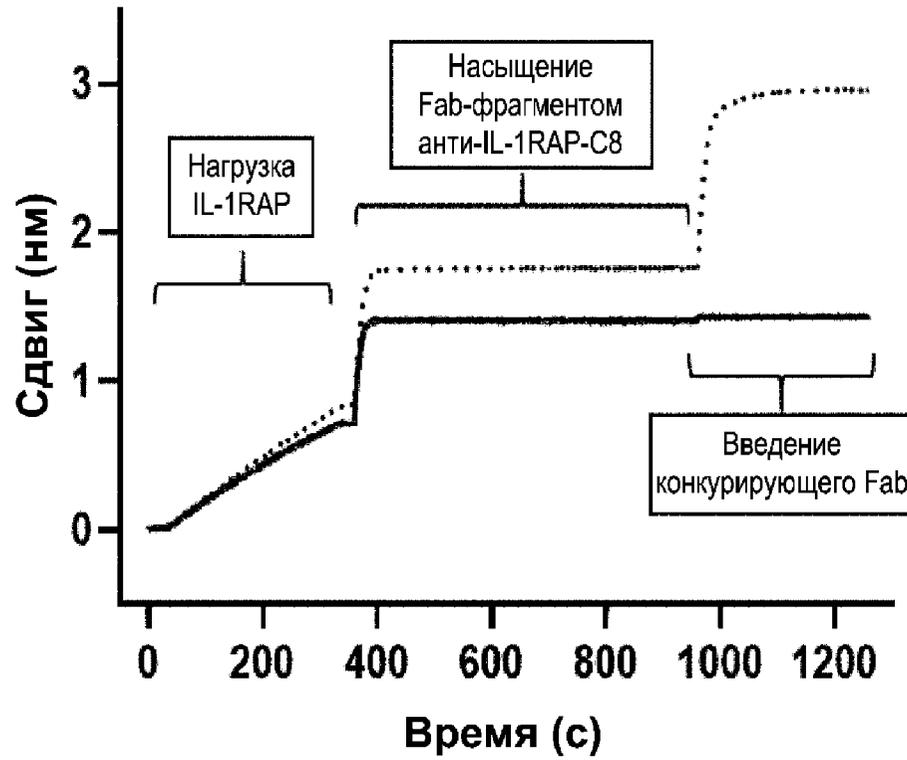
ФИГ. 2А



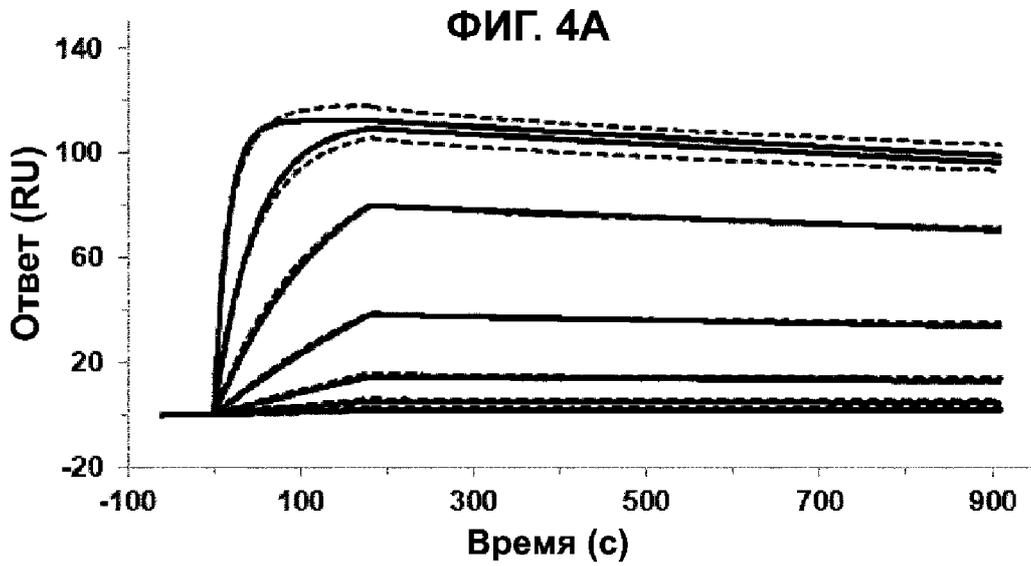
ФИГ. 2В



ФИГ. 3

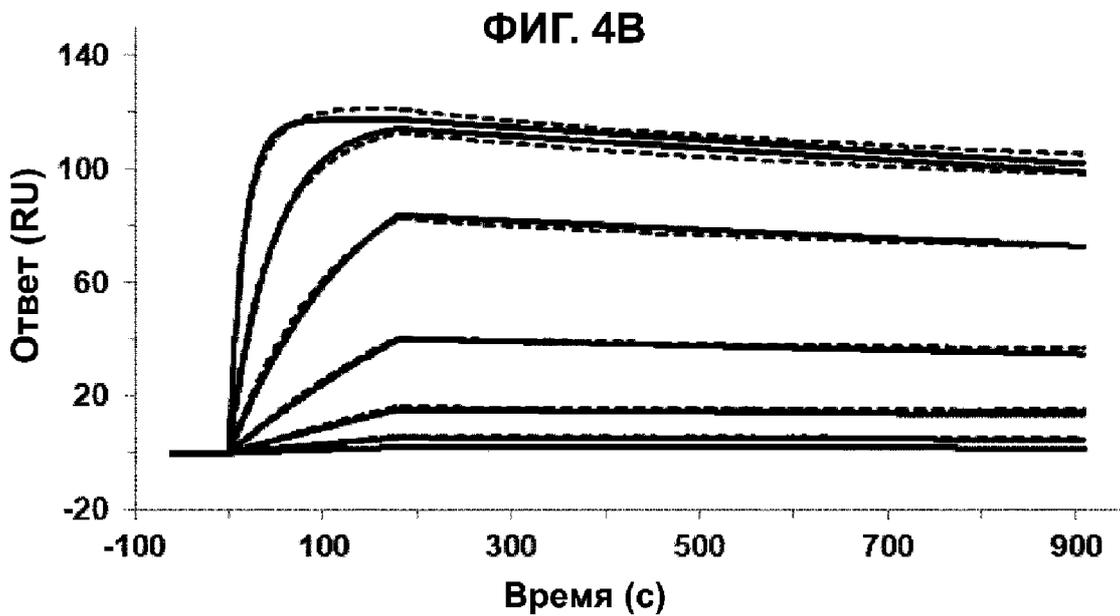


— Fab-фрагмент анти-IL-1RAP-C3
..... Fab-фрагмент анти-IL-1RAP-E1



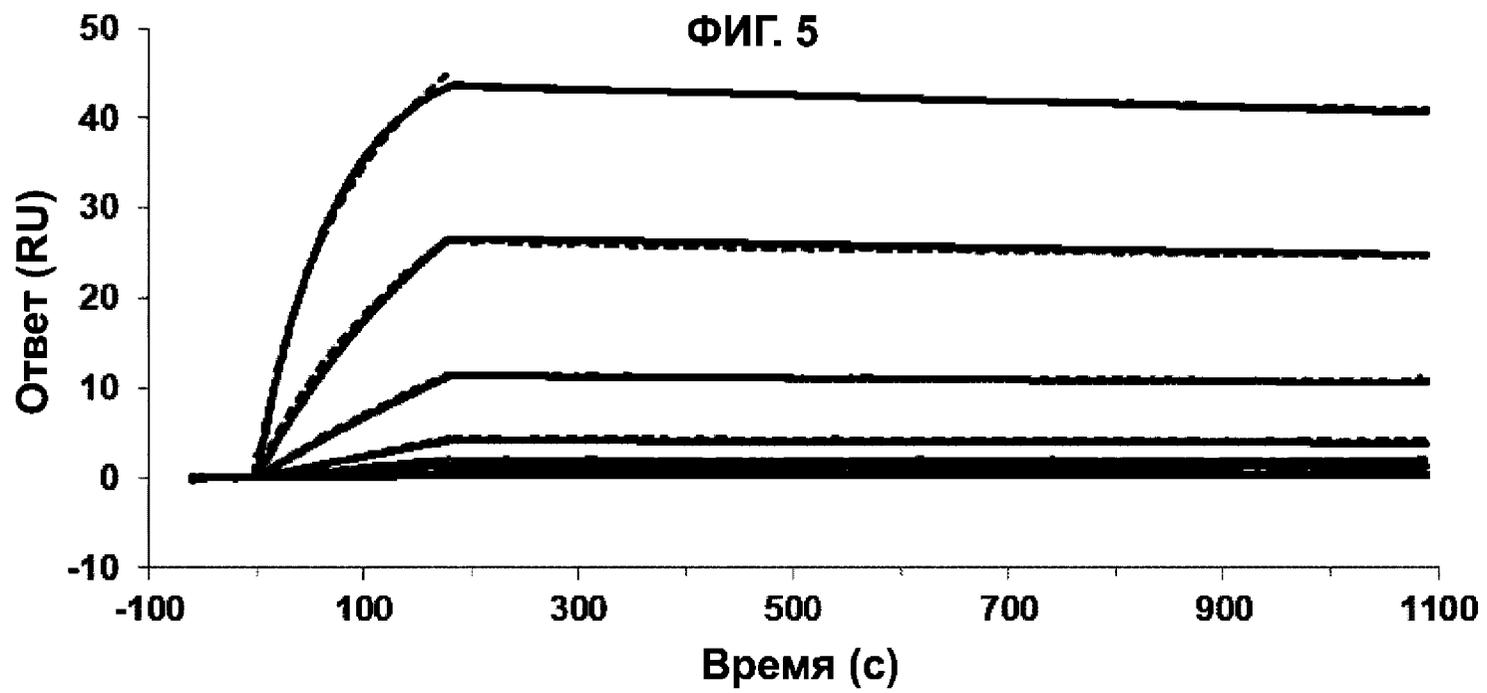
Ка (1/Мс): 6,33E+5
KD (M): 2,67E-10

Kd (1/с): 1. 69E-4



Ка (1/Мс): 6,38E+5
KD (M): 3,07E-10

Kd (1/с): 1,96E-4

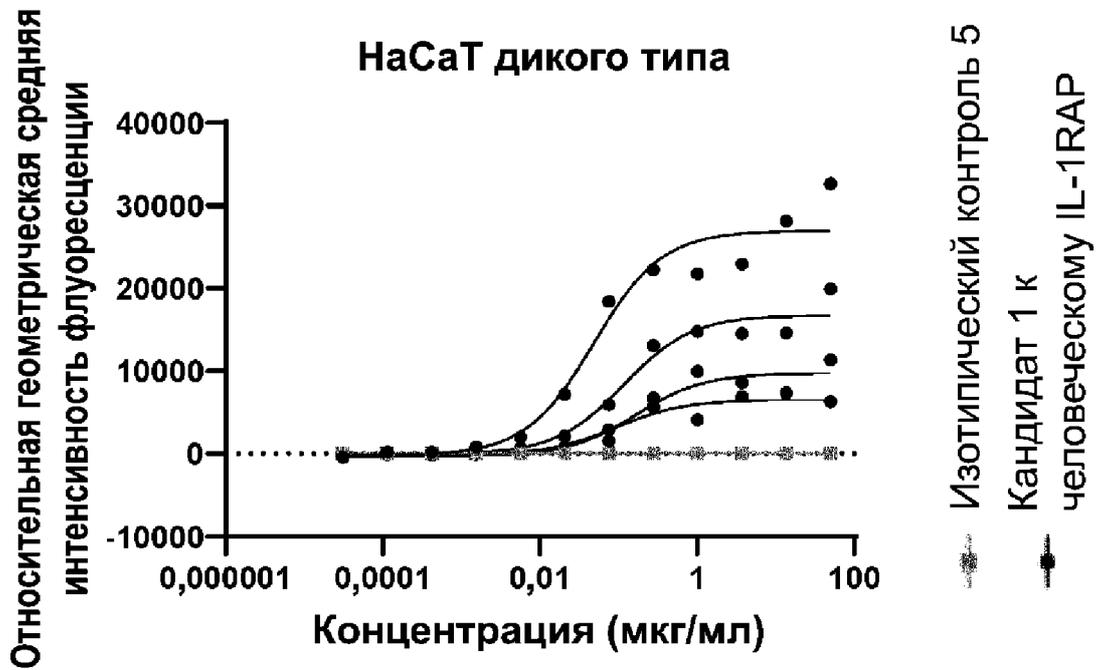


Ka (1/Mc): 1,37E+5

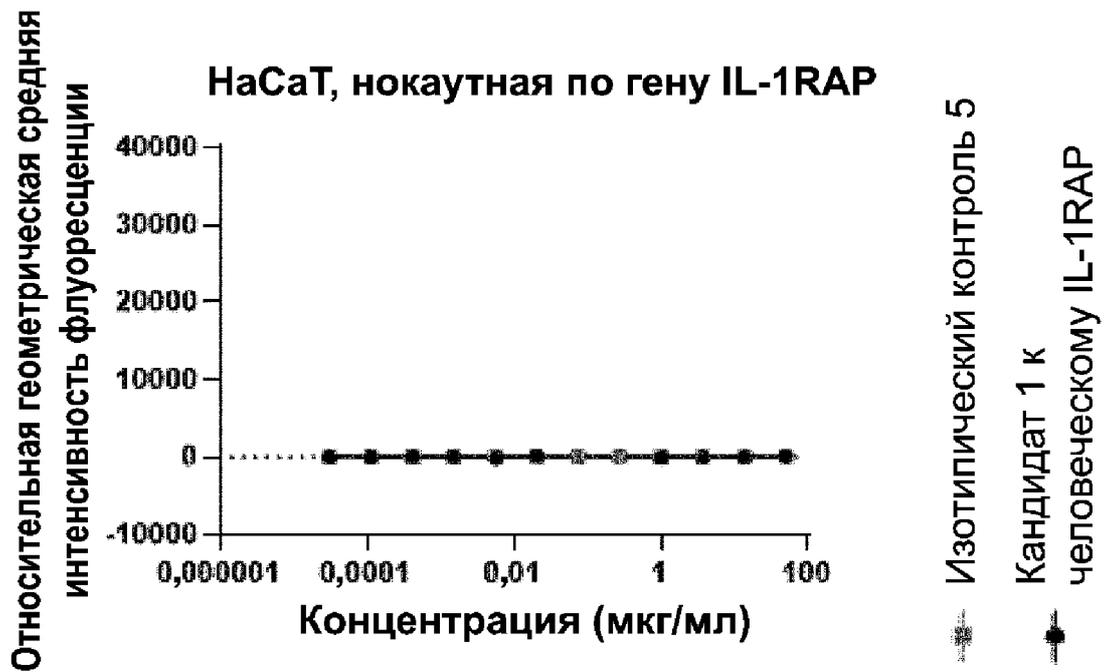
Kd (1/c): 7,60E-5

KD (M): 5,57E-10

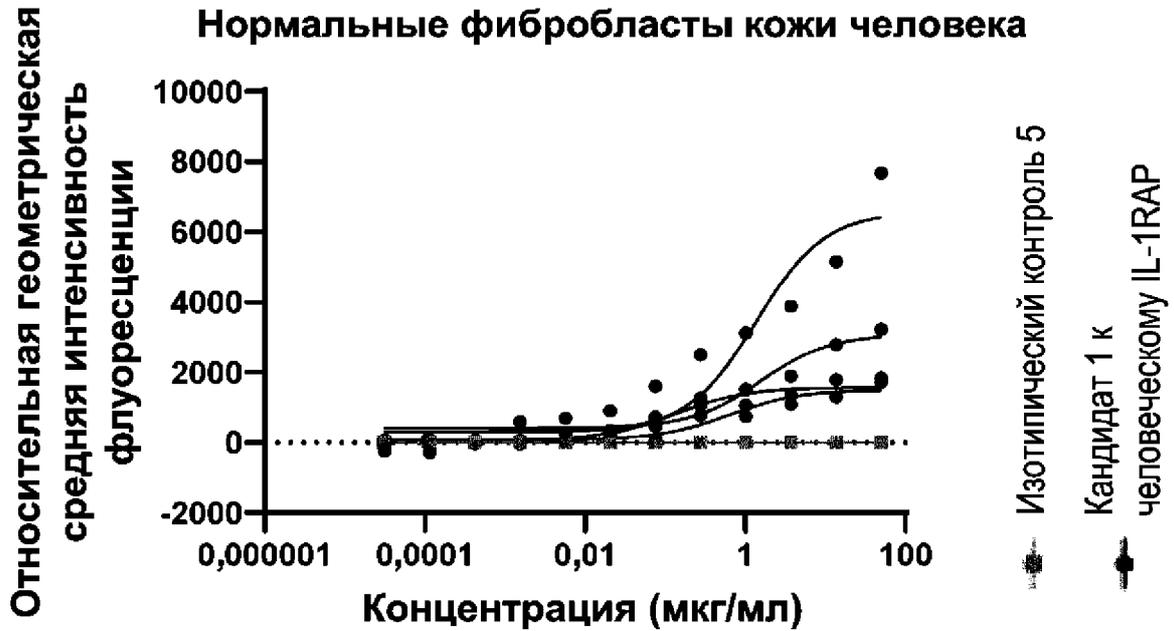
ФИГ. 6А



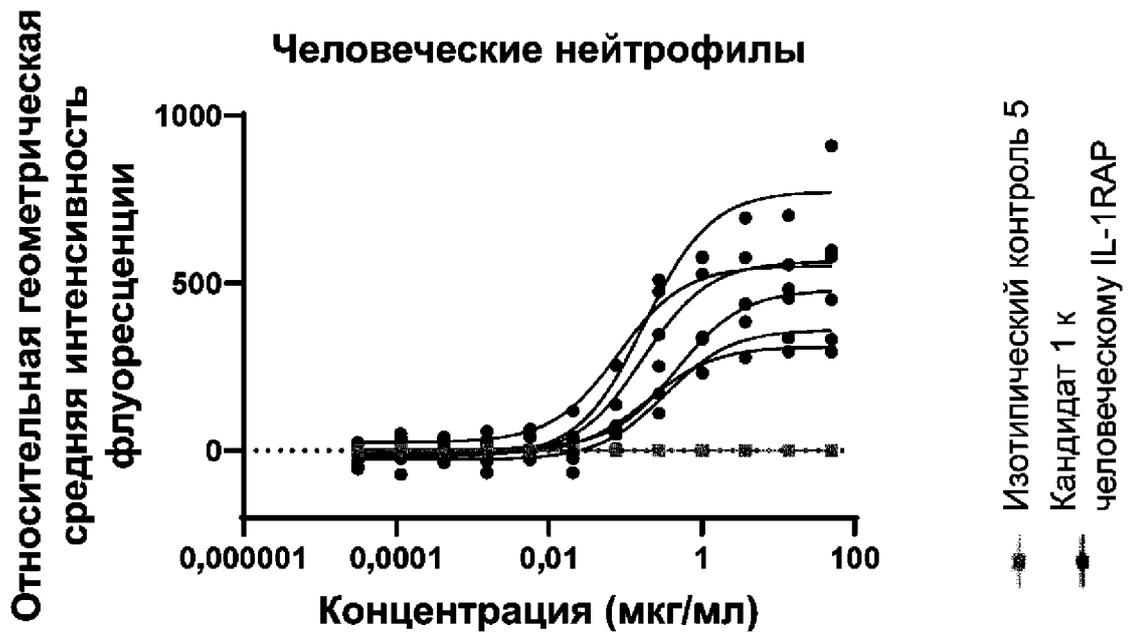
ФИГ. 6В



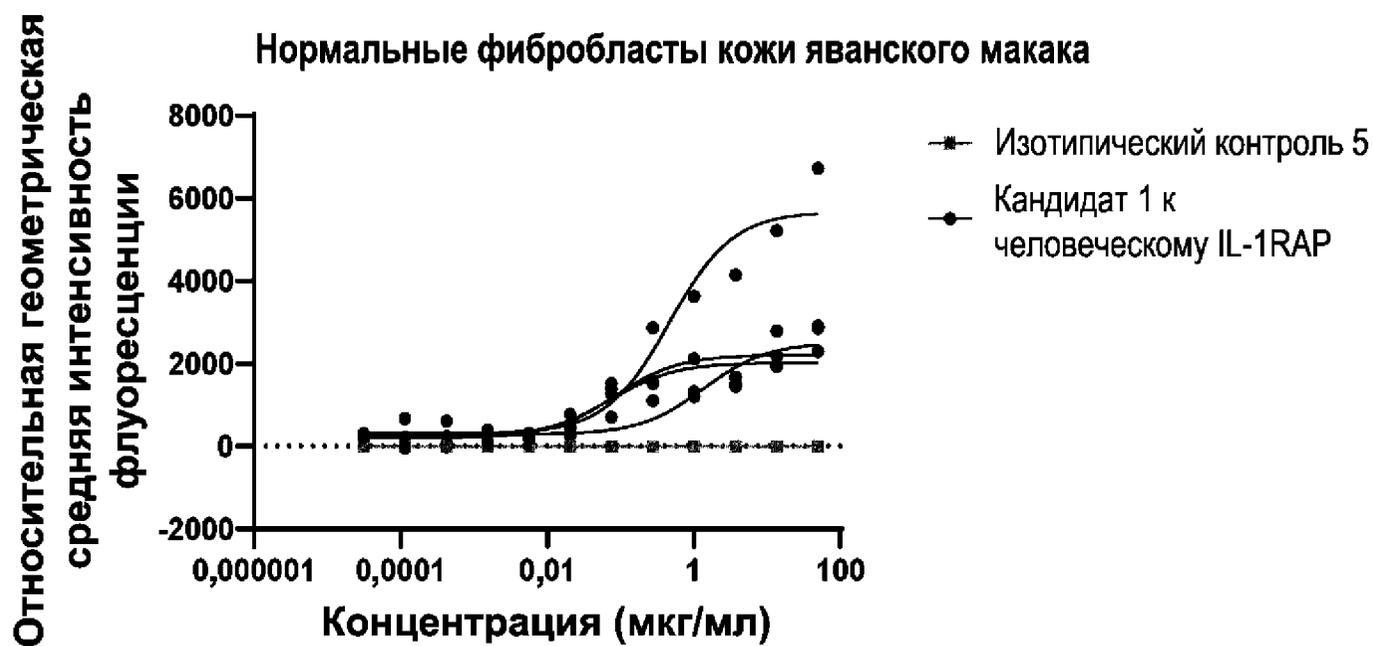
ФИГ. 6С



ФИГ. 6D

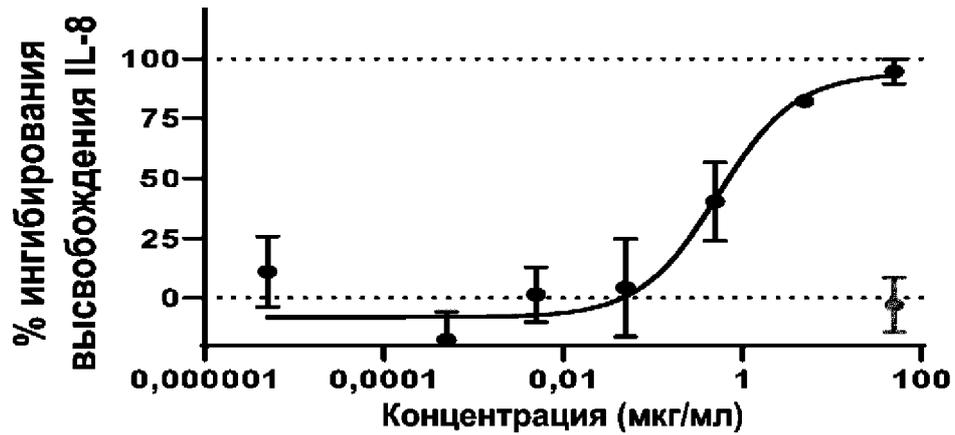


ФИГ. 6Е



ФИГ. 7А

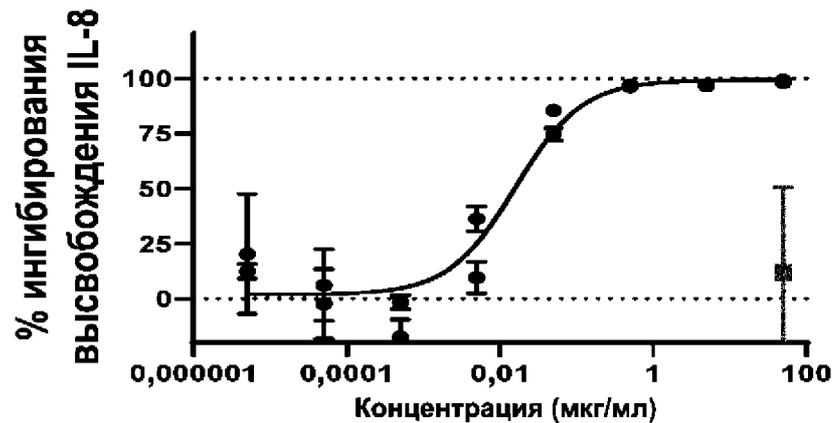
Стимуляция NaCaT дикого типа IL-1 β



- Изотипический контроль 5
- Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP

ФИГ. 7В

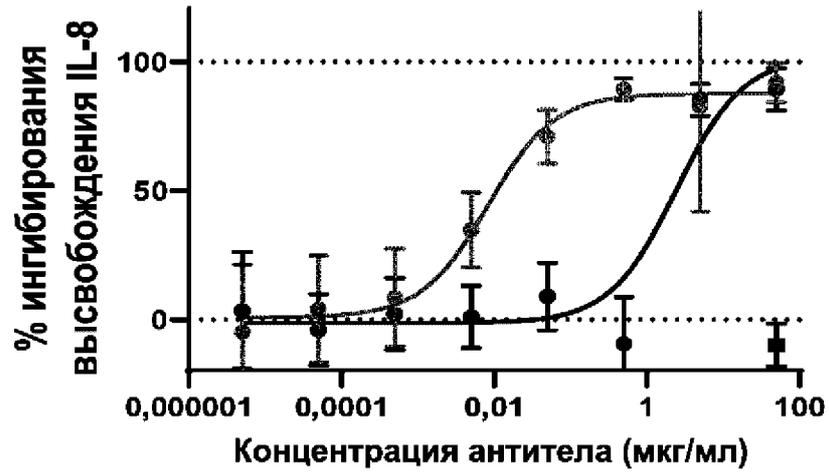
Стимуляция NaCaT дикого типа IL-36 γ



- Изотипический контроль 5
- Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP

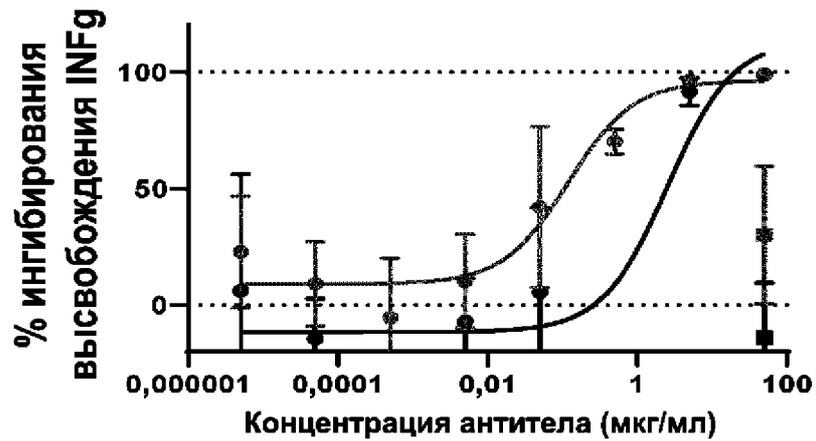
ФИГ. 8А

Стимуляция IL-1 β высвобождения IL-8

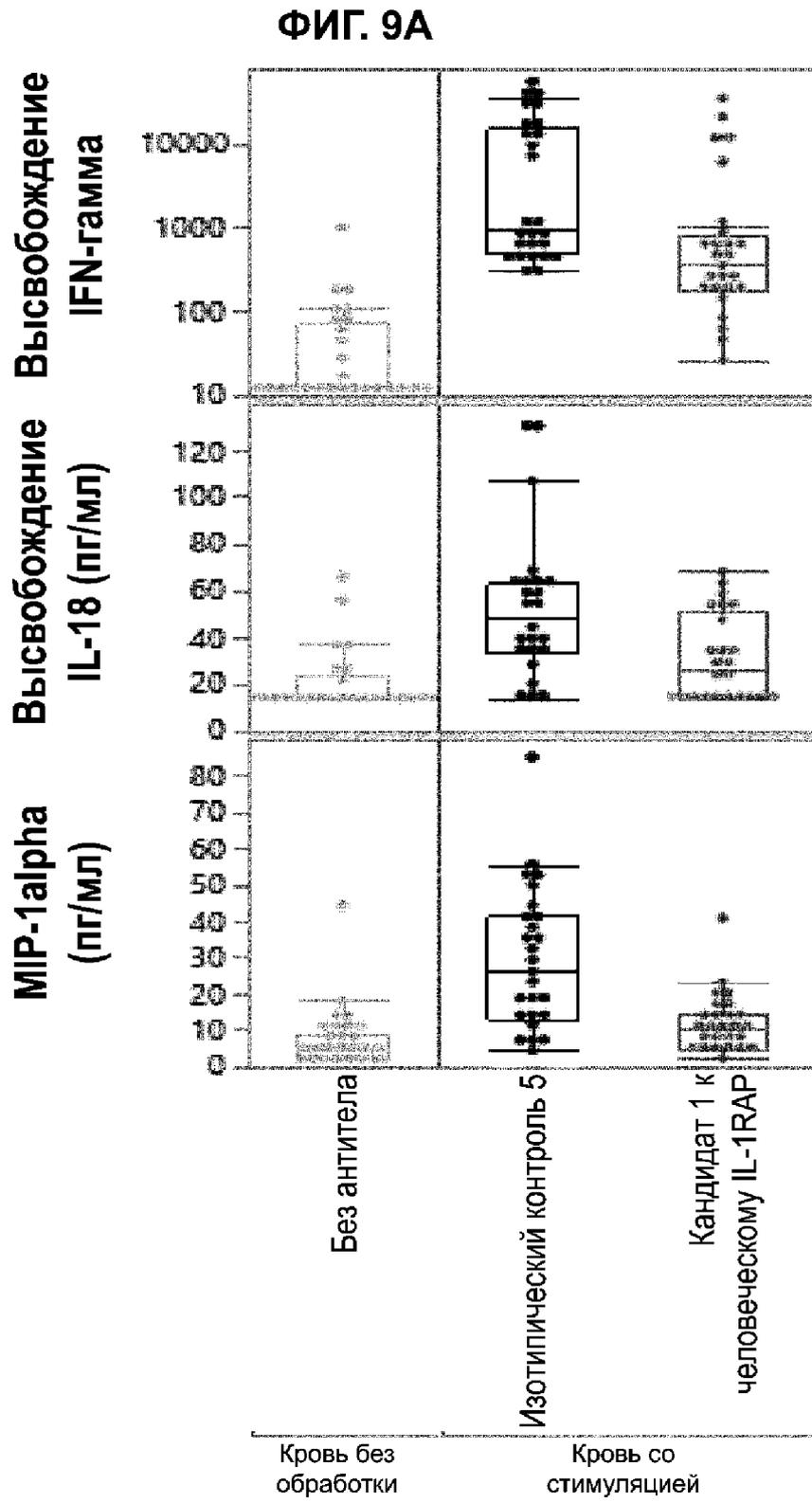


ФИГ. 8В

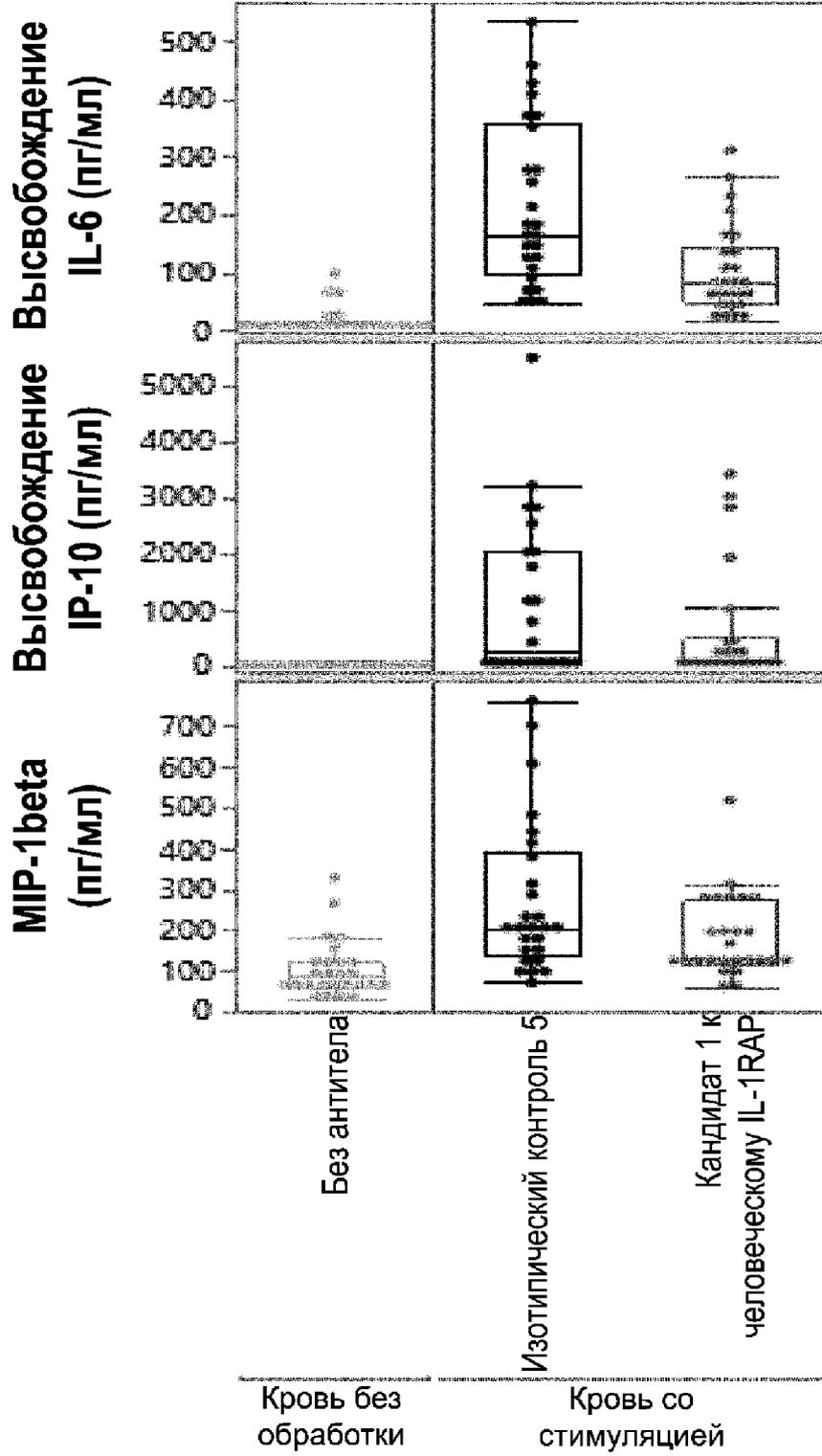
Стимуляция IL-12/IL-33 высвобождения IFN γ



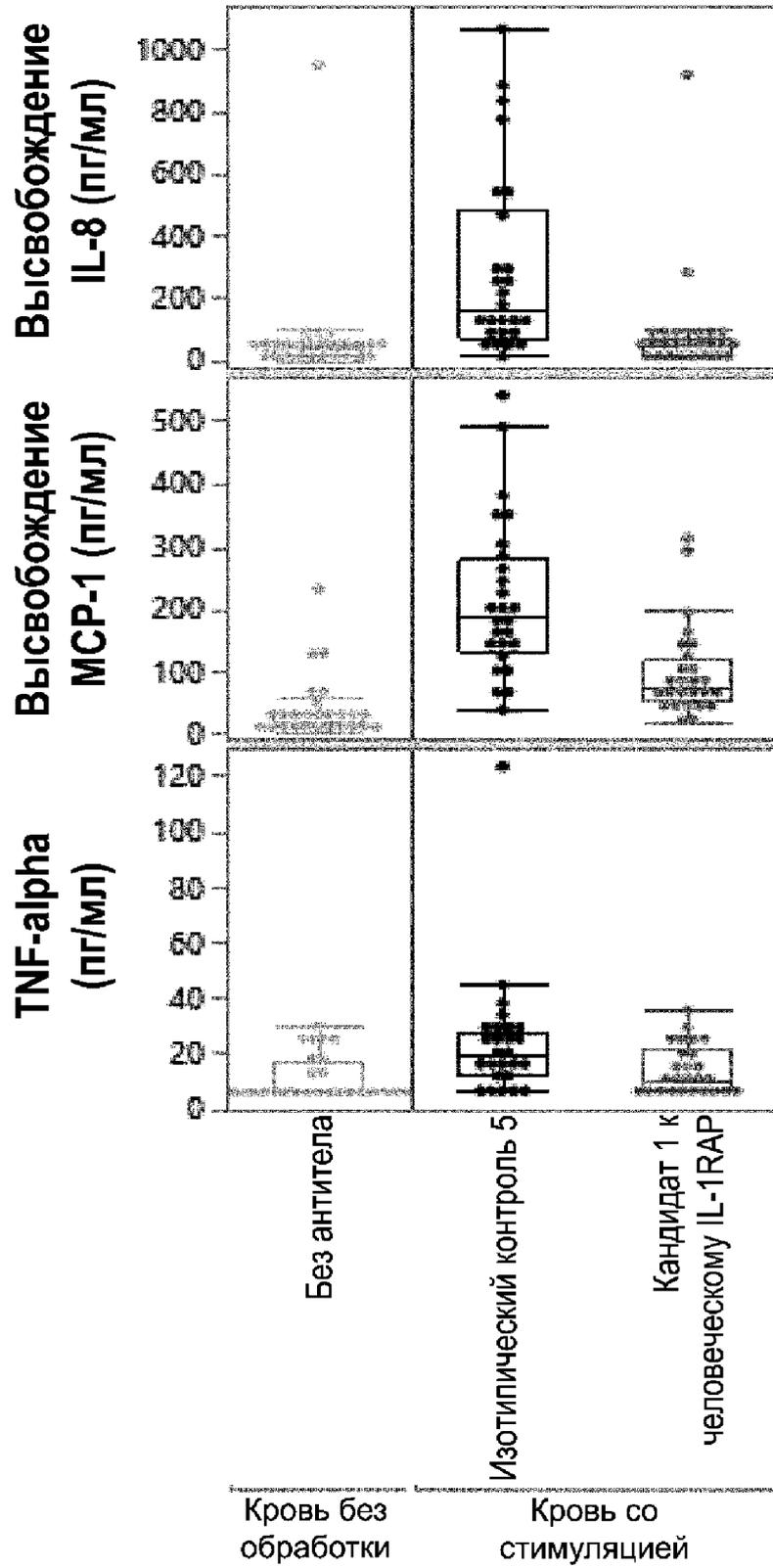
- Изотипический контроль 4
- Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP
- Изотипический контроль 4 + sIL-1RAP
- Кандидат 1 к человеческому IL-1RAP + sIL-1RAP



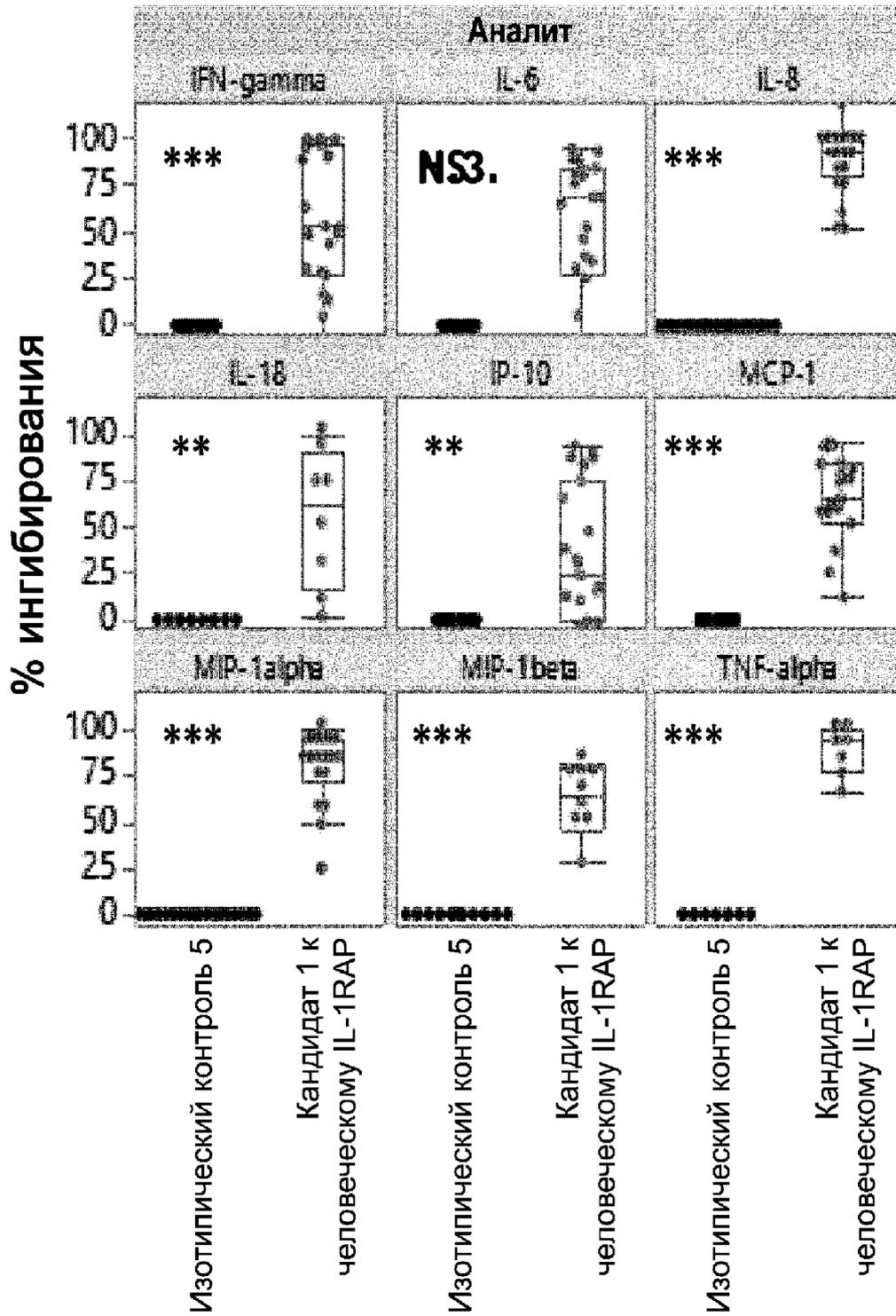
ФИГ. 9В



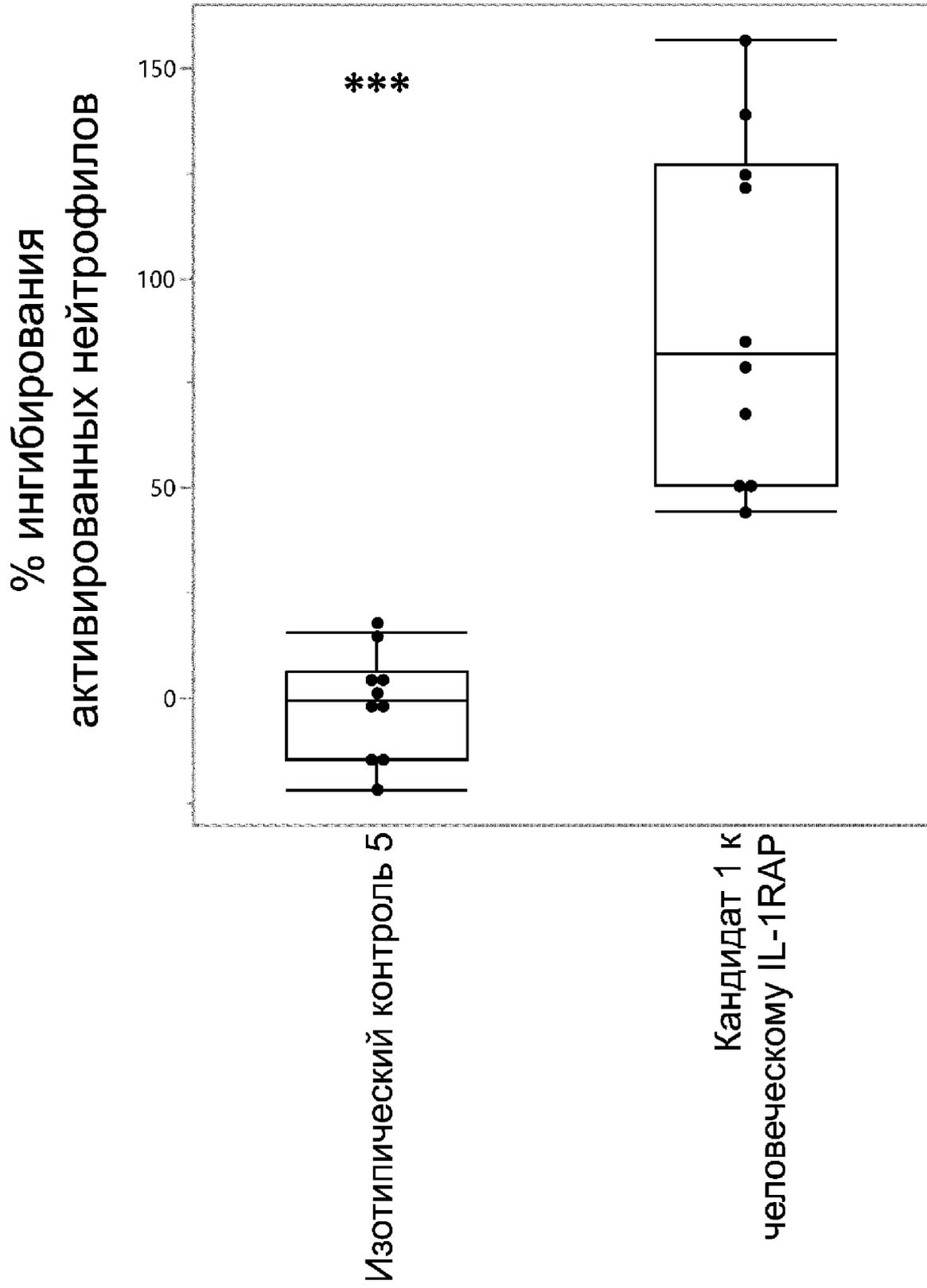
ФИГ. 9С



ФИГ. 9D

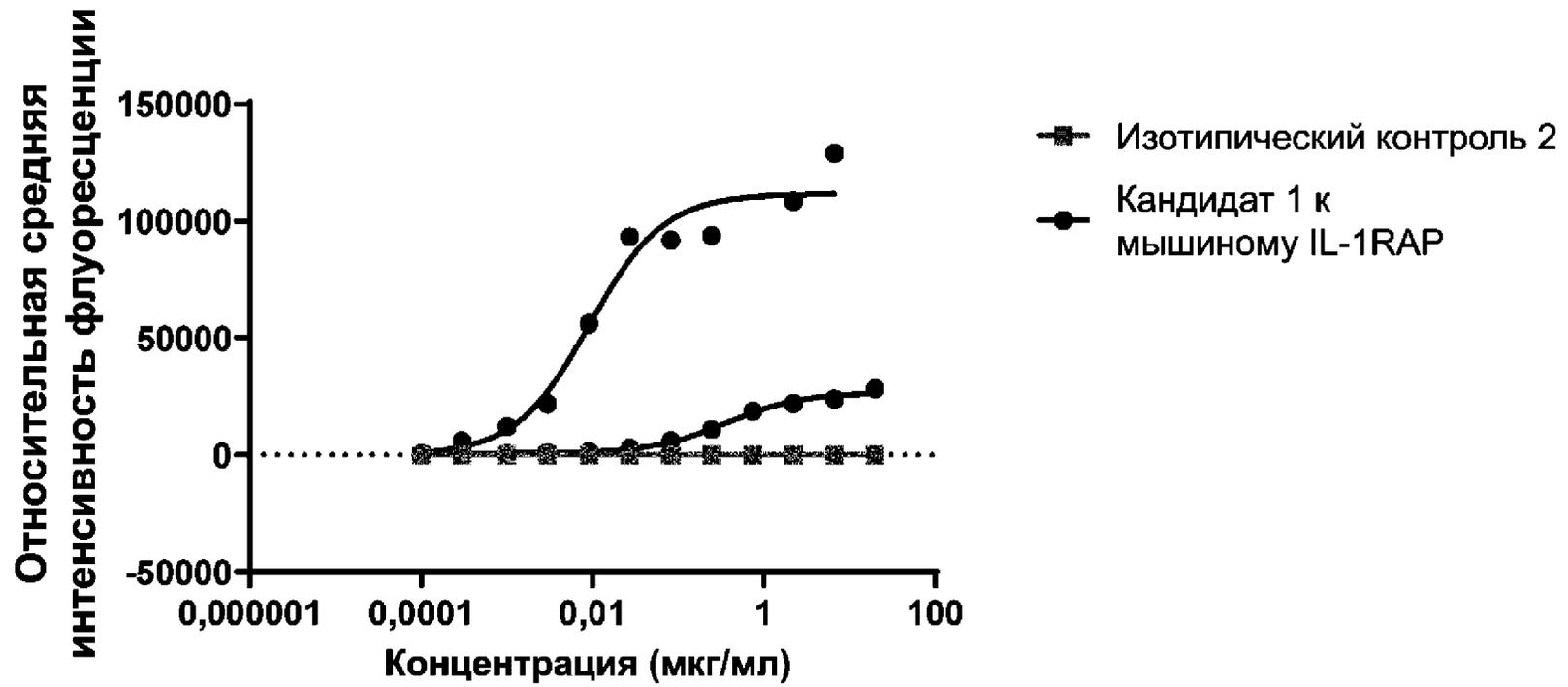


ФИГ. 10

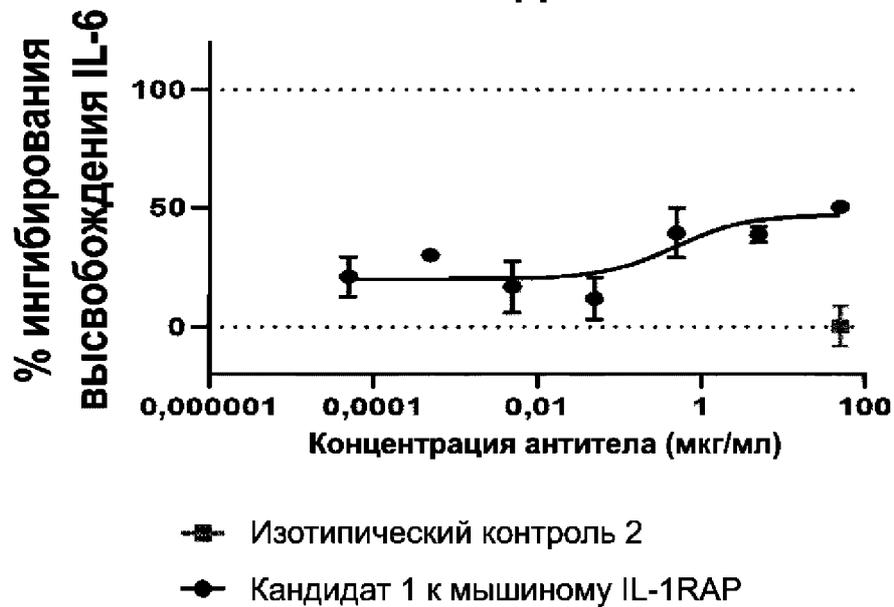


ФИГ. 11

NIH-3T3

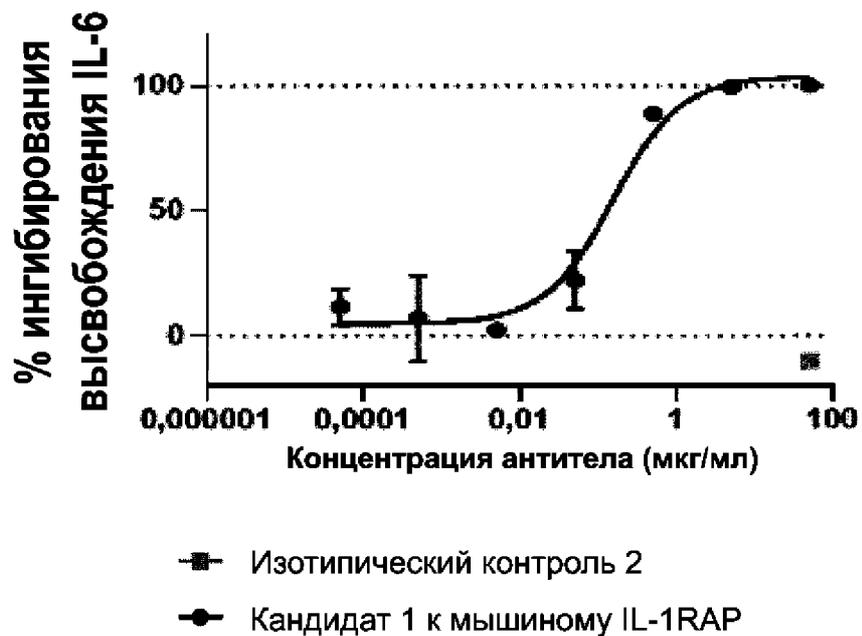


ФИГ. 12А
Стимуляция mIL-1b
высвобождения mIL-6



ФИГ. 12В

Стимуляция hIL-33
высвобождения mIL-6



ФИГ. 12С

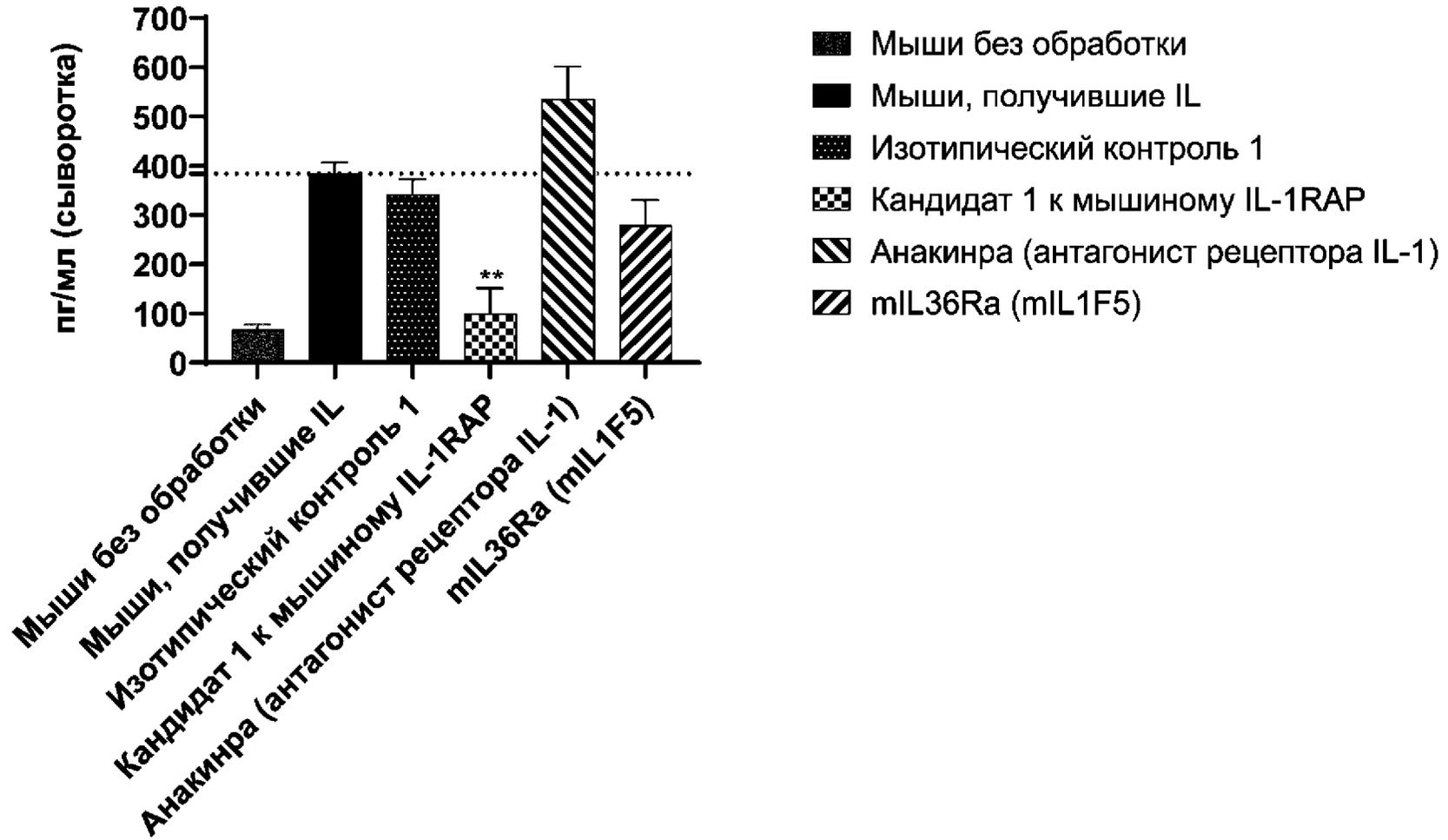
Стимуляция разными
mIL-36 высвобождения
CXCL-1/GRO-а



- Изотипический контроль 2
- Кандидат 1 к мышиному IL-1RAP

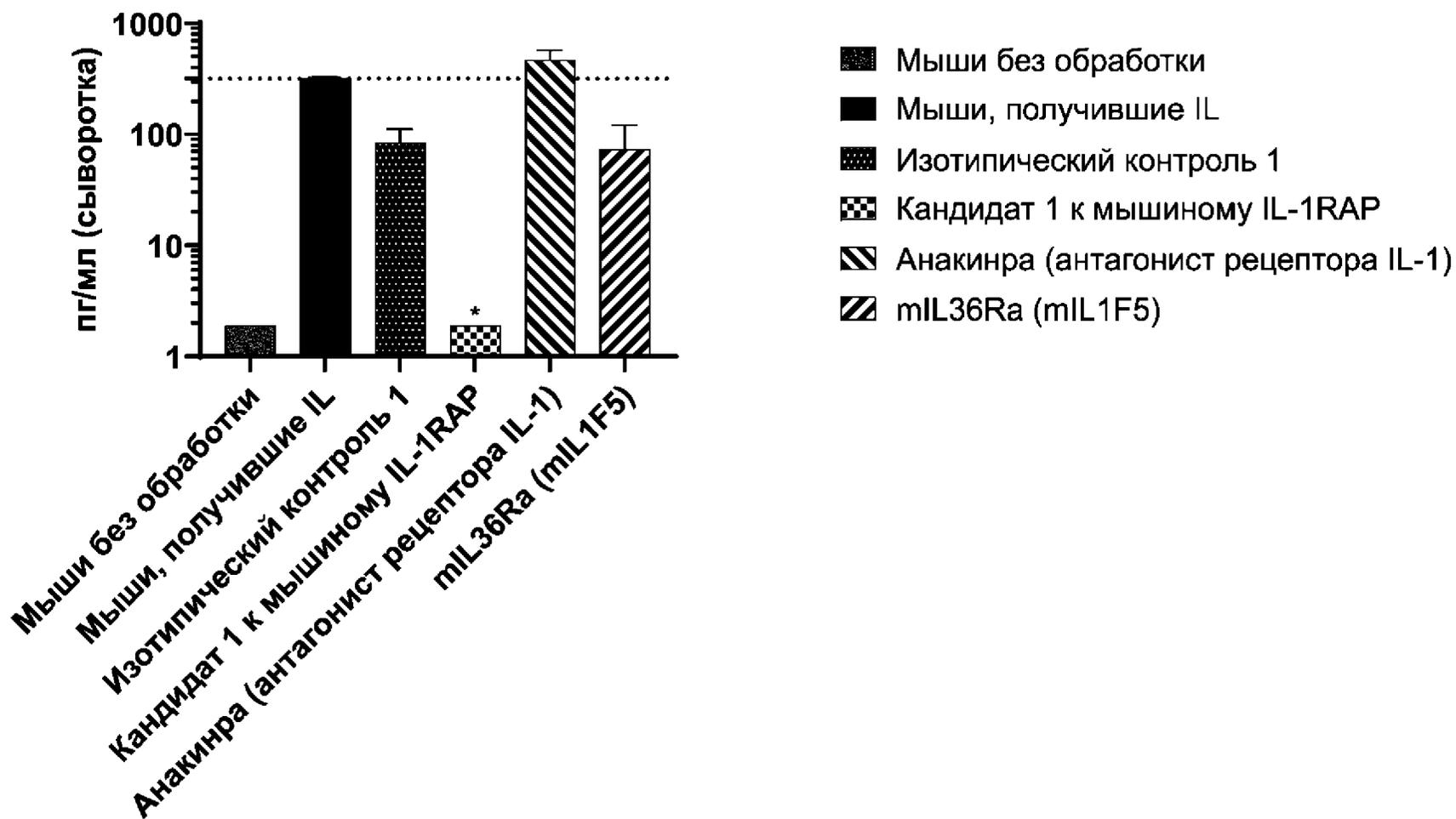
ФИГ. 13

Высвобождение IL-5 (T = 24 ч)



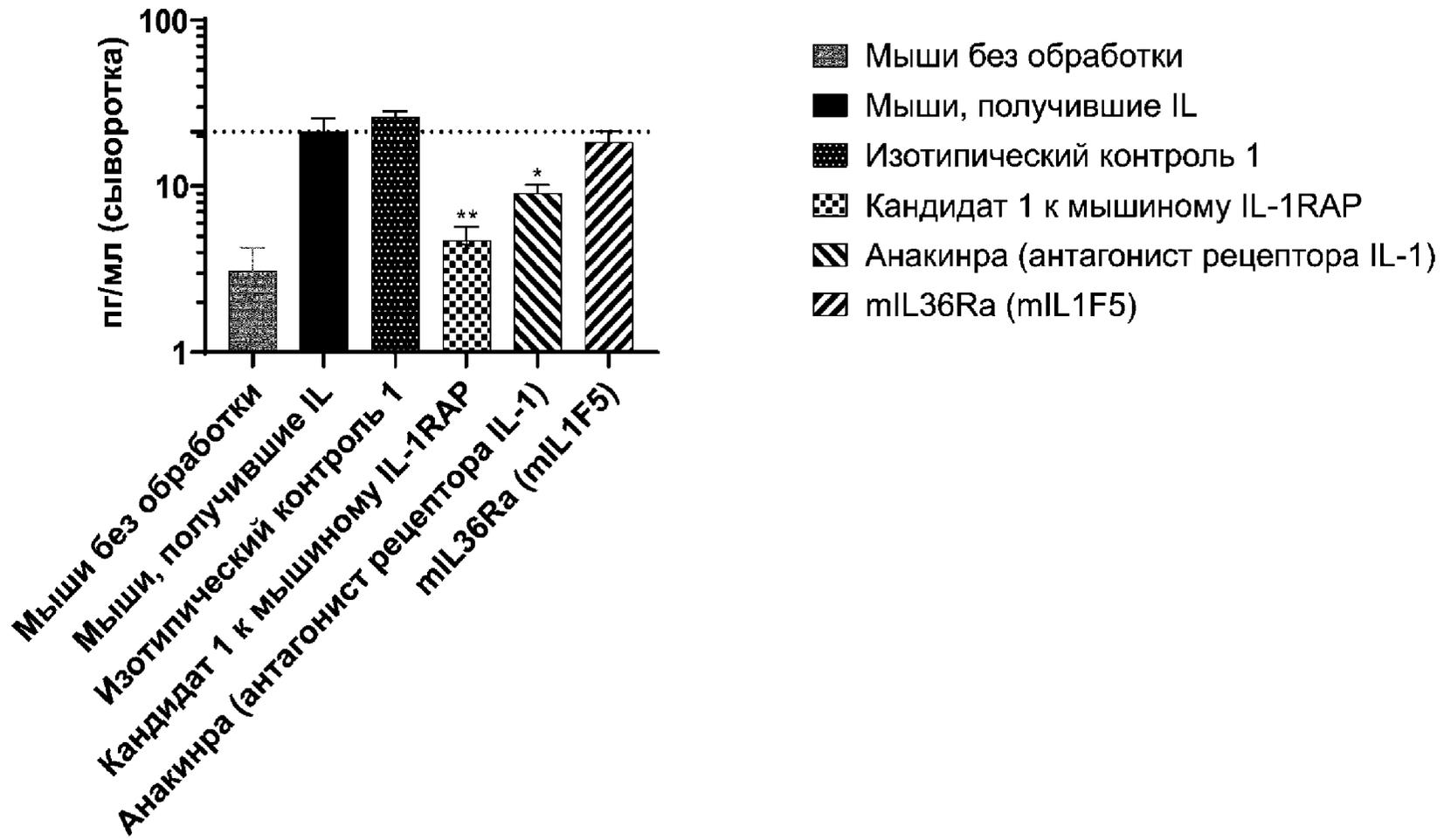
ФИГ. 14

Высвобождение IL-5 (T = 72 ч)



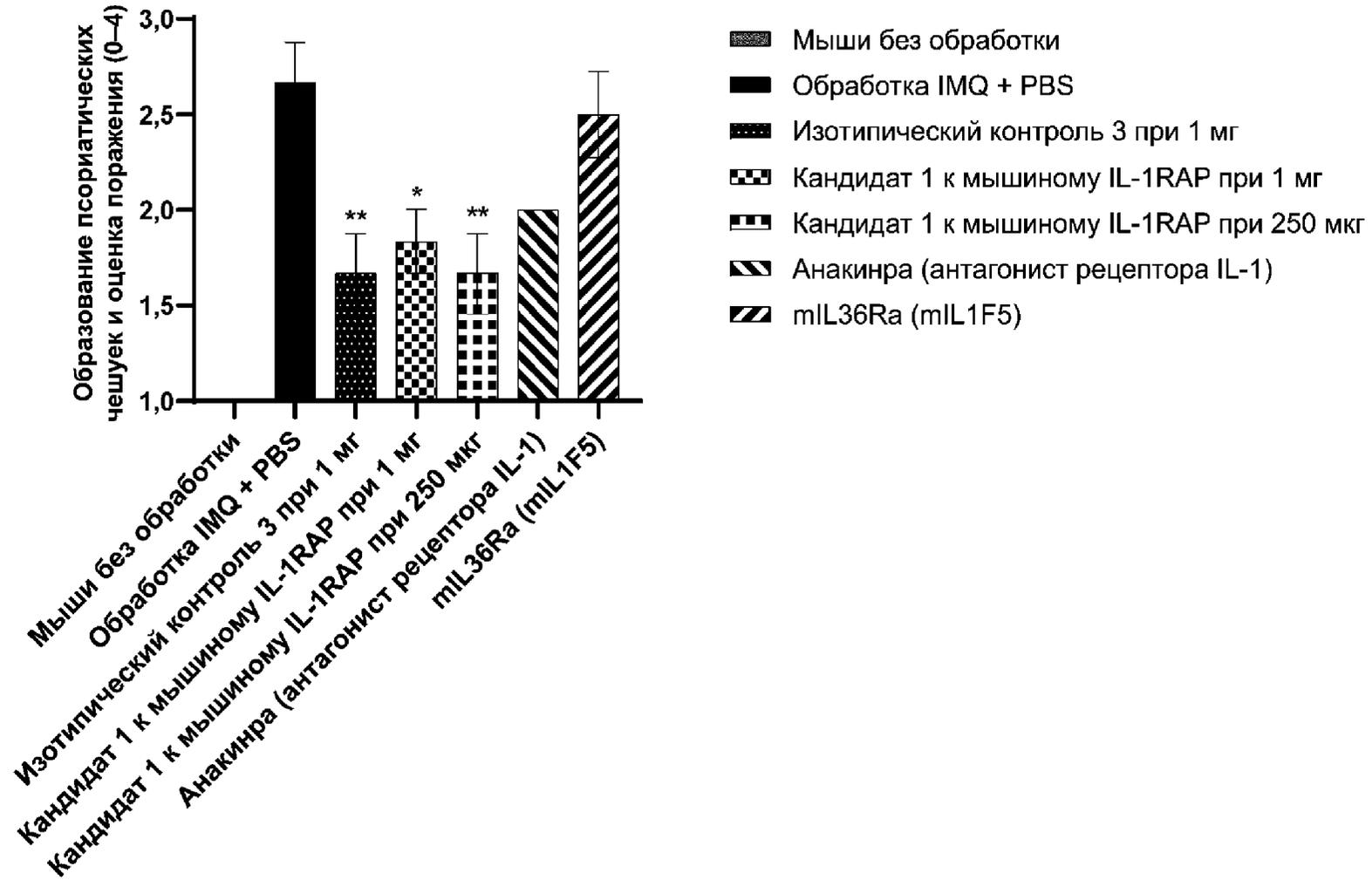
ФИГ. 15

Высвобождение Gro-альфа (T = 72 ч)

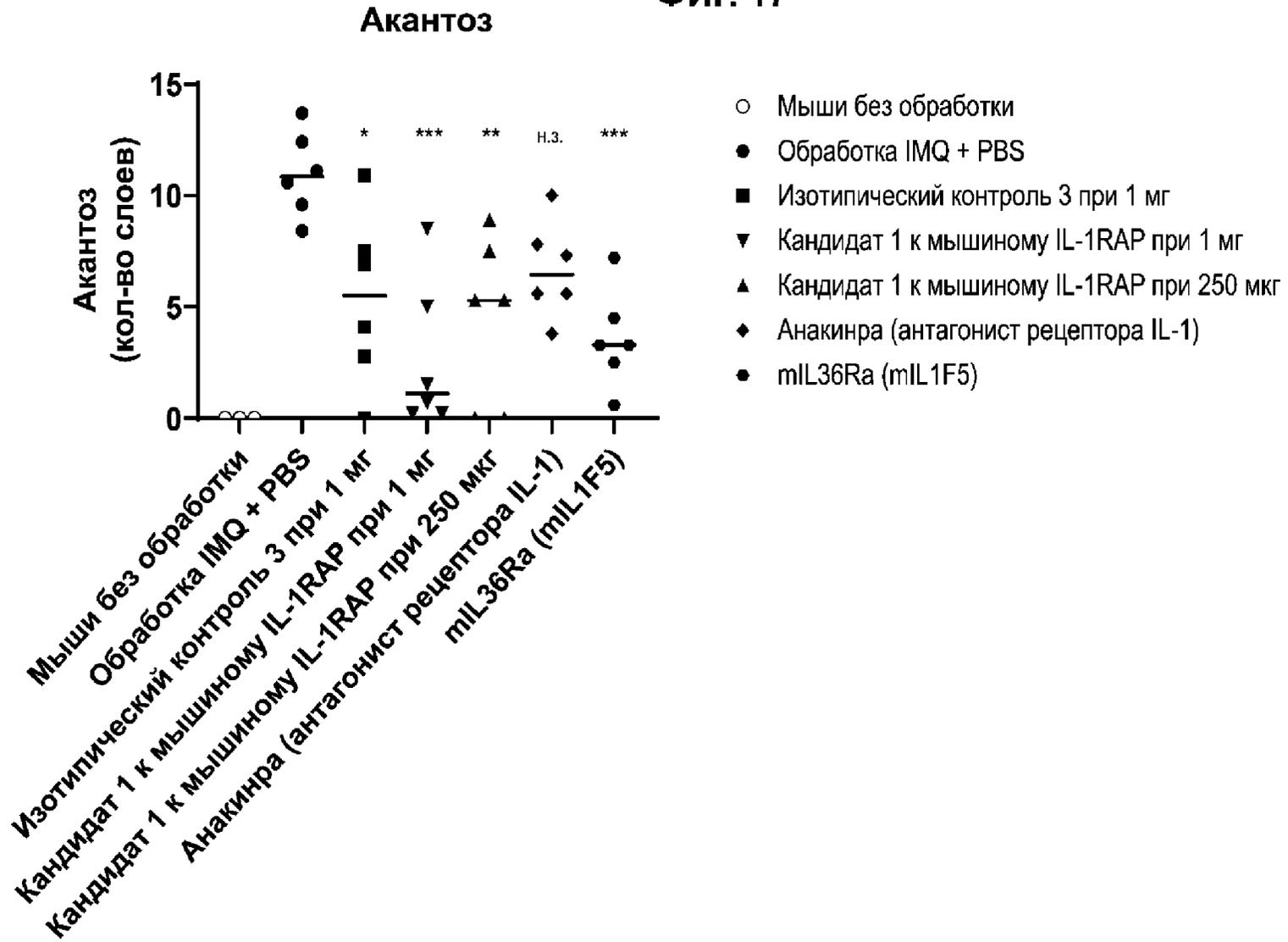


ФИГ. 16

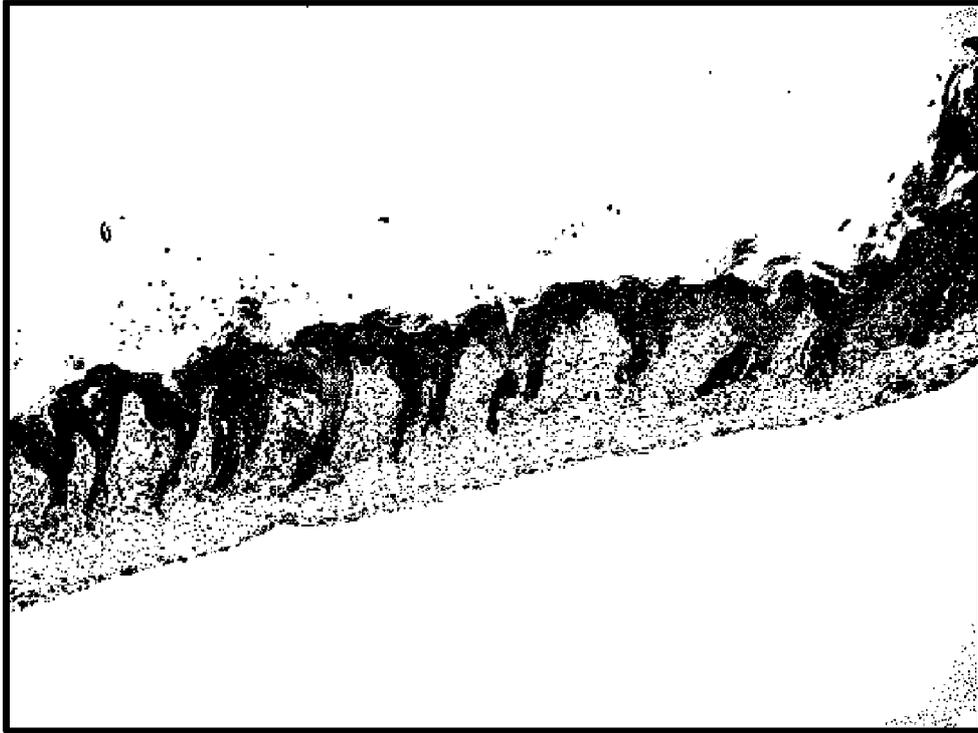
Образование псориатических чешуек и оценка поражения на день 10



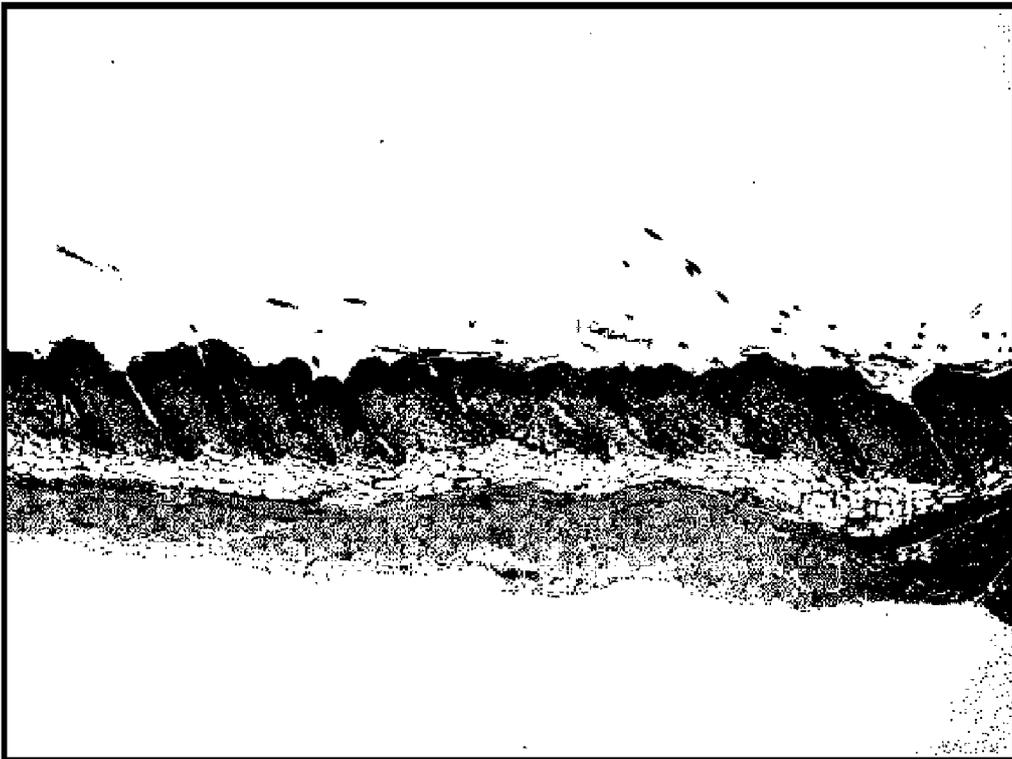
ФИГ. 17



ФИГ. 18А



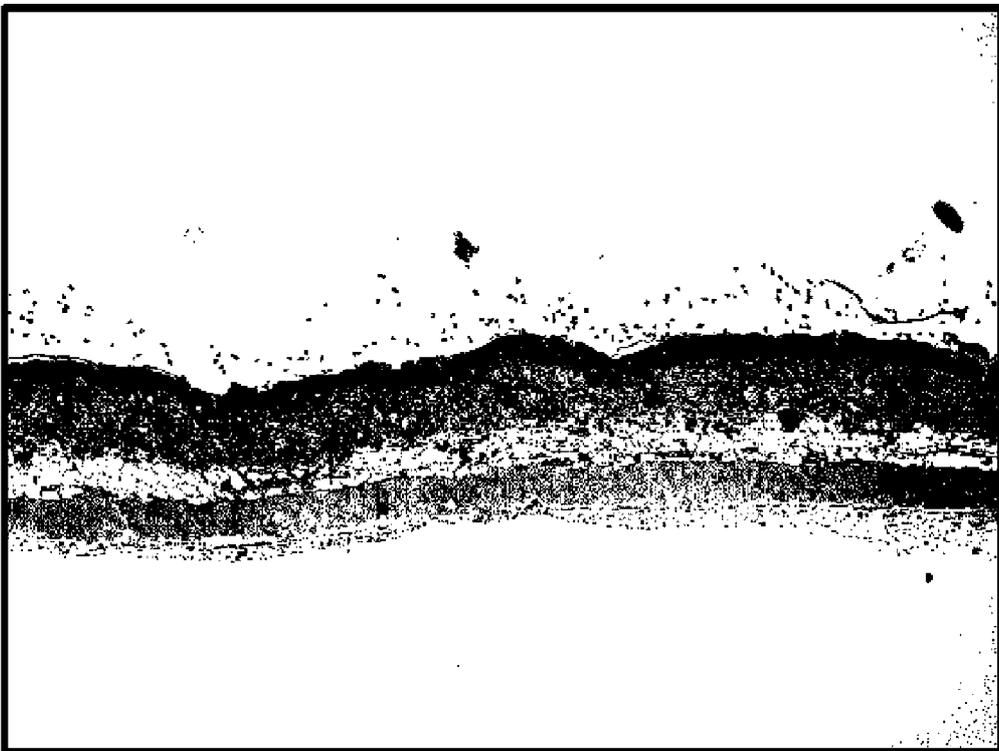
ФИГ. 18В



ФИГ. 18С



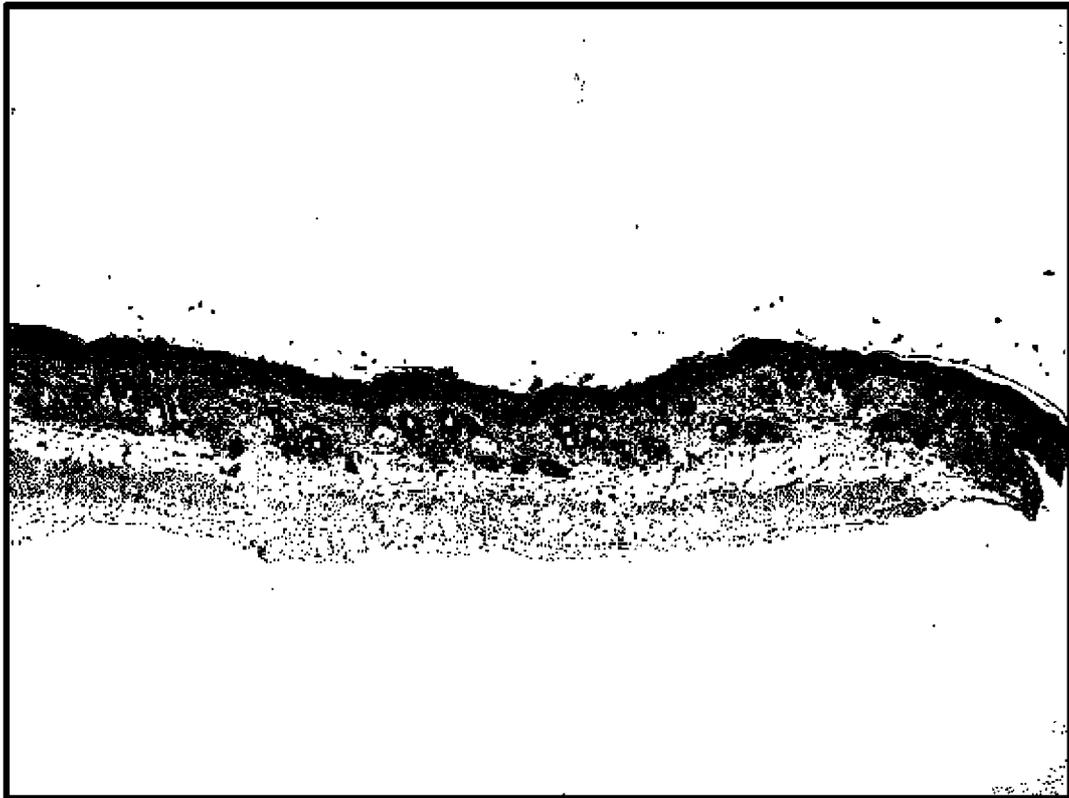
ФИГ. 18D



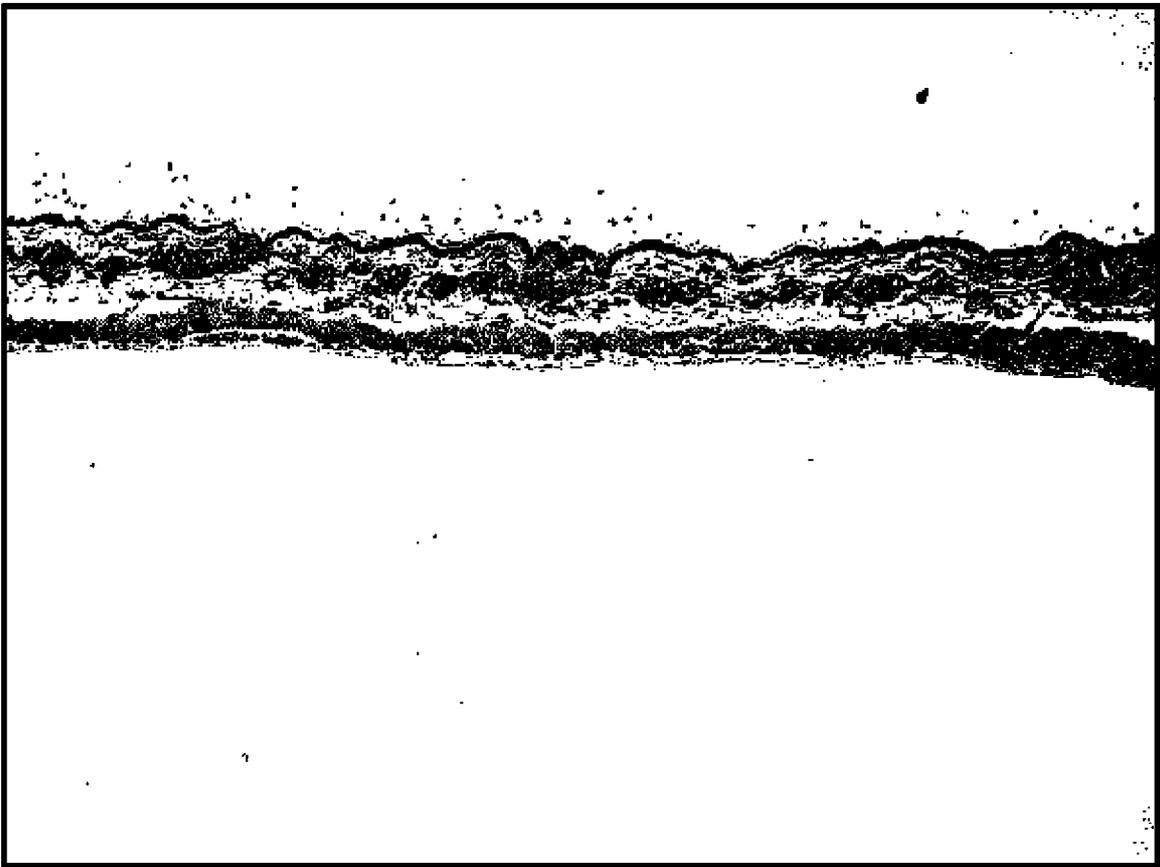
ФИГ. 18Е



ФИГ. 18F

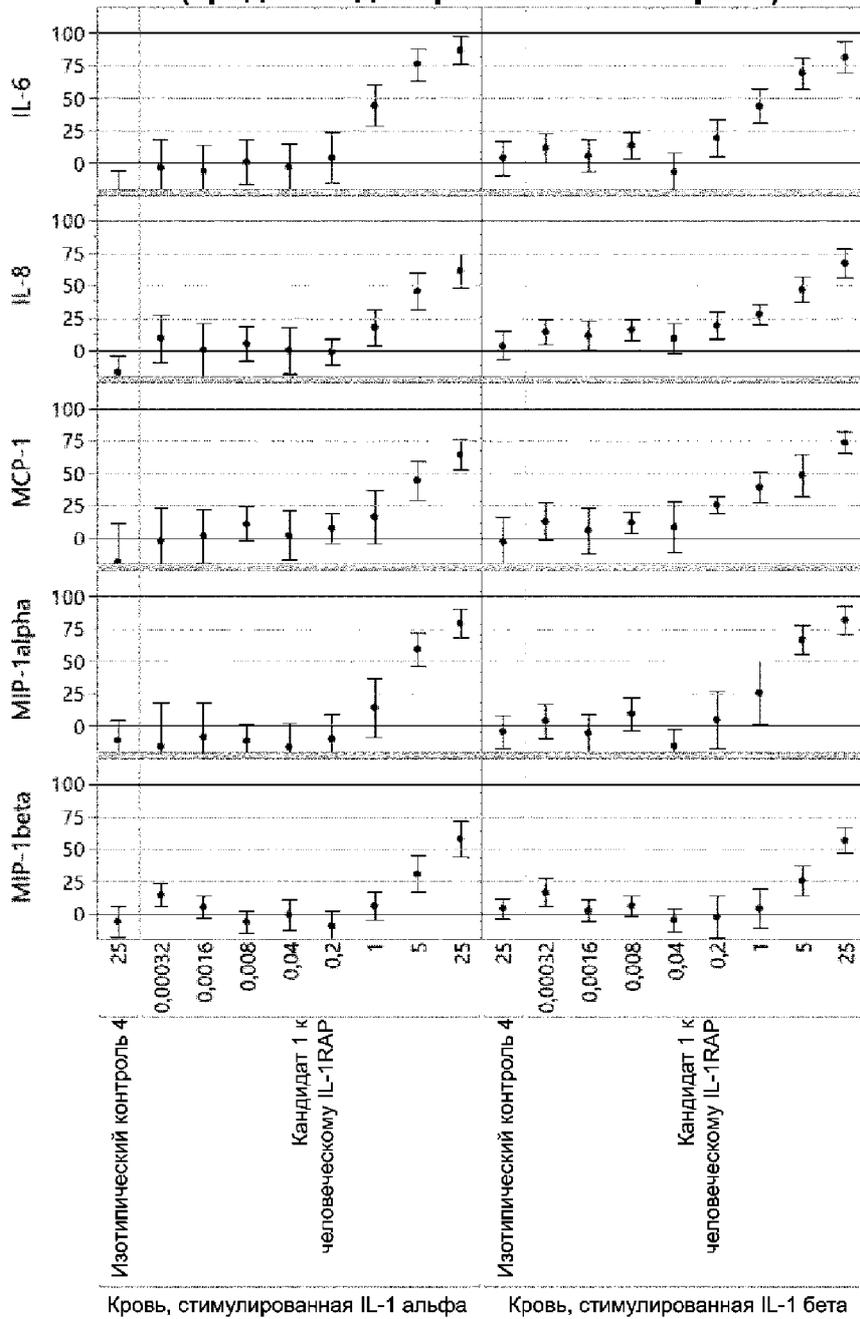


ФИГ. 18G



ФИГ. 19А

Процентные значения ингибирования
(среднее \pm доверительный интервал)



<i>Кол-во ответивших доноров</i>	IL-6	IL-8	MCP-1	MIP- 1alpha	MIP- 1beta
Стимуляция IL-1 α	13	11	10	8	10
Стимуляция IL-1 β	15	15	10	10	11

ФИГ. 19В