

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038502**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.07

(51) Int. Cl. **C07K 16/24 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201591813

(22) Дата подачи заявки
2014.03.13

(54) АНТИТЕЛА-АНТАГОНИСТЫ К ИНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА И ИНТЕРФЕРОНУ ОМЕГА

(31) 61/788,302

(32) 2013.03.15

(33) US

(43) 2016.03.31

(86) PCT/US2014/025701

(87) WO 2014/151422 2014.09.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Чи Эллен, Коннор Джудит, Хуан
Чичи, Джордан Джаррат, Линь-
Шмидт Сефань, Ло Цзиньцюань, Лу
Лу, Мартинес Кристиан, Обмолова
Галина, Свансон Роналд (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) BENOIT et al. 'A monoclonal antibody to recombinant human IFN-alpha receptor inhibits biologic activity of several species of human IFN-alpha, IFN-beta, and IFN-omega Detection of heterogeneity of the cellular type I IFN receptor.' J Immunol. (01 February 1993) Vol. 150, No. 3, Pgs. 707-716. entire document.

US-A1-20070014724

LAFLEUR et al. 'Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes.' J Biol Chem. (26 October 2001, published online 20 August 2001) Vol. 276, No. 43, Pgs. 39765-71. entire document

TERENZI et al. 'Distinct induction patterns and functions of two closely related interferon-inducible human genes, ISG54 and ISG56.' J Biol Chem. (10 November 2006, published online 13 September 2006) Vol. 281, No. 45, Pgs. 34064-34071. entire document

US-A-5317089

US-A1-20050019306

US-A1-20100021477

US-A1-20120114667

US-A1-20090186027

(57) Антитела-антагонисты, широко нейтрализующие интерферон-α и интерферон-ω, полинуклеотиды, кодирующие антитела или фрагменты, а также способы получения и использования названных продуктов применимы для лечения заболеваний, связанных с повышенной выработкой IFNα и IFNω. Интерфероны I типа представляют собой семейство цитокинов, все из которых подают сигнал через экспрессируемый повсюду гетеродимерный рецептор (IFNAR), оказывая антивирусное, антипролиферативное и иммуномодулирующее действие.

B1**038502****038502****B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение в широком смысле относится к антителам-антагонистам, нейтрализующим интерферон- α и интерферон- ω , полинуклеотидам, кодирующим антитела или фрагменты, а также к способам получения и использования названных продуктов.

Уровень техники изобретения

Интерфероны I типа представляют собой семейство цитокинов, все из которых подают сигнал через экспрессируемый повсюду гетеродимерный рецептор (IFNAR), оказывая антивирусное, антипролиферативное и иммуномодулирующее действие. У людей интерферон типа I состоит по меньшей мере из 12 подтипов белка интерферона- α и 1 подтипа каждого из интерферона- β , интерферона- ϵ , интерферона- κ и интерферона- ω . Индукция интерферона типа I происходит в ответ как на стерильные, так и микробные лиганды. В то время как антивирусные и антипролиферативные действия интерферона типа I использовали в клинике для лечения инфекционных и онкологических заболеваний, антагонисты интерферона типа I, разрабатываются для иммуноопосредованных воспалительных показаний.

Множество иммуноопосредованных воспалительных заболеваний, таких как СКВ, диабет 1-го типа, псориаз, первичный синдром Шегрена, системный склероз и ревматоидный артрит, показывают признаки повышенного типа интерферона в различной степени, как это определено в избытке генных транскриптов, индуцируемых интерфероном обычно называют характерной чертой интерферона, которая присутствует в цельной крови и/или ткани.

Подходы антагонистов интерферона типа I, которые в настоящее время находятся на клинической разработке для лечения волчанки включают несколько подходов к нейтрализации подтипов интерферона- α , а не других интерферона типа I (β , ϵ , κ , ω) при помощи антител к интерферону- α , таких, как описанные в патенте США № 7,087,726 патент США; № 8,025,88 2 и публикации заявки на патент США - № US2008/0160030. Данные клинического испытания показывают частичное снижение характерных признаков интерферона типа I у пациентов с антителами к анти-IFN α (Merrill et al., Ann Rheum Dis 70:1905-1913, 2011; Yao et al., Arthritis Rheum 60:1785-1796, 2009) и улучшение признаков и симптомов СКВ, показатели вспышки и стероидную нагрузку на 24 неделе в предварительно указанном биомаркере определенной группы с низким показателем Interferon Signature Metric (ISM) у пациентов с волчанкой умеренной и высокой степени активности. У пациентов в предопределенной группе с высоким показателем ISM эффективности не наблюдалось (Kalunian et al., 2012 ACR/ARHP Annual Meeting; Abstract # 2622, 2012).

Антитела к анти-IFNAR1 являются альтернативой лечения волчанки (Wang et al., 2013; Clinical Pharmacology & Therapeutics accepted article preview 14 February 2013; doi: 10.1038/clpt.2013.35). Предполагается, что блокада IFNAR1 предотвращает сигнализацию IFN, вызываемое всеми интерферонами типа I, включая IFN β . IFN β может играть более важную роль в противовирусной защите, поскольку конкретная делеция гена, кодирующего IFN β несет значительную восприимчивость к хозяину вирусов по сравнению с аналогичными подверженными мышам, имеющими функциональный IFN β (Lazear et al., J Virol 85:7186-7194, 2011; Deonarain et al., J Virol 74: 3404-340, 2000; Deonarain et al., Circulation 110: 3540-3543, 2004; Gerlach, et al., J Virol 80: 3438-3444, 2006).

Таким образом, существует необходимость в дополнительных антителах для лечения волчанки и других иммуноопосредованных воспалительных заболеваний.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано ингибирование высвобождения IP-10 в цельной крови, индуцированного фиг. 1A) 100 Ед/мл эндогенного лейкоцитарного IFN (вирусного генеза) или фиг. 1B) 250 Ед/мл рекомбинантного человеческого IFN ω в указанных концентрациях.

На фиг. 2 показано ингибирование IFN типа I, индуцированного иммунным комплексом, полученным от пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), различными антителами, как указано. Комбинация анти-IFN α 1 и анти-IFN ω , анти-IFN α 2 и анти-IFN ω или анти-IFN α 3 и анти-IFN ω обеспечивает более выраженное ингибирование по сравнению с одним анти-IFN α антителом. Широко нейтрализующее анти-IFN α /IFN ω антитело (M4 3) показало дальнейшее подавление общей активности.

На фиг. 3 показано процентное соотношение (%) ингибирования повышенных характерных генных признаков СКВ при применении анти-IFN ω , анти-IFN α антитела или комбинации обоих. Исходная повышенная IFN-индуцируемая экспрессия генов при отсутствии лечения антителом нормирована до 100%.

На фиг. 4 показана общая молекулярная структура комплекса IFN ω /FabM43. VH обозначен H; VL обозначен L, а в верхнем левом углу показан IFN ω .

На фиг. 5 показана общая молекулярная структура комплексов фиг. 5A) IFN α 4A/Fab357 и фиг. 5B) IFN ω /Fab357. Для домена Fab показана только часть Fv. Fab537 представляет собой Fab C2595.

На фиг. 6A показана общая молекулярная структура комплекса IFN α 4A/FabM88.

Фиг. 6B - типичная электронная плотность (2mFo-DFc на 1.5 σ) вокруг части эпитопного участка на сайте комбинирования антигенов. VH обозначен H; VL обозначен L, а в верхнем левом углу показан IFN α 4A.

На фиг. 7 показана структура IFN α 4A и сравнение с IFN ω и IFN α . Фиг. 7A - IFN α .4A. Обозначено пять основных спиралей. Рядом с коротким спиральным сегментом обозначена длинная соединительная петля AB. Фиг. 7B - IFN ω (pdb code 3se4) и фиг. 7C - IFN β (pdb id 1au1). Фиг. 7D - структурное сравнение с IFN β . Основные различия по всему спиральному сегменту AB обозначены овалом.

Фиг. 8 - режим нейтрализации M88. Структура IFN ω /IFNAR1/IFNAR2 (pdb id 3se4) и M88/IFN α 4 наложены на интерфероны.

Изложение сущности изобретения

Один аспект настоящего изобретения представляет собой выделенное моноклональное антитело, которое связывается с и нейтрализует активность человеческого интерферона омега (IFN ω) и по меньшей мере четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти подтипов человеческого интерферона альфа (IFN α).

В другом аспекте настоящего изобретения выделенное антитело конкурирует за связывание с человеческим IFN ω и человеческим IFN α подтипов IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 с выделенным антителом, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 и вариабельный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24; или VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28.

В других аспектах настоящего изобретения выделенное антитело связывается с IFN ω на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 1; выделенное антитело связывается с IFN α 4a на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 19; выделенное антитело ингибирует активность IFN, индуцированного иммунным комплексом системной красной волчанки (СКВ).

Дополнительные аспекты настоящего изобретения представляют собой выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело по данному изобретению; и фармацевтическую композицию, содержащую антитело по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Другой аспект данного изобретения заключается в способе лечения или профилактики заболевания, связанного с повышенной выработкой IFN α и IFN ω , который включает введение терапевтических эффективных количеств выделенных антител, представленных в данном изобретении, нуждающимся в лечении пациентам в течение периода достаточного для лечения или профилактики заболевания. В дополнительном аспекте настоящего изобретения заболеванием, связанным с повышенной выработкой IFN α и IFN ω является системная красная волчанка (СКВ).

Следующий аспект данного изобретения заключается в способе ингибирования взаимодействия IFN ω и IFN α подтипов IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 с IFNAR у пациента, нуждающегося в лечении, включающий введение выделенного антитела по изобретению пациенту в течение времени, достаточного для предотвращения взаимодействия IFN ω и IFN α подтипов IFN α B2, IFN α C, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 с IFNAR.

Подробное описание изобретения

Все публикации, упоминаемые в данном описании, включая без ограничений патенты и патентные заявки, включенные путем ссылок, являются частью настоящего документа, как если бы они были изложены непосредственно в настоящем документе.

Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины используются только в целях описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не являются ограничивающими. Все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области, к которой имеет отношение настоящее изобретение.

В настоящем документе описаны примеры способов и материалов, хотя для анализа настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. При описании и изложении формулы настоящего изобретения будут использоваться следующие термины.

При использовании в настоящем документе термины "специфическое связывание" или "специфически связывает" или "связывает" относятся к антителу, проявляющему большую аффинность при связывании с заданным антигеном, по сравнению с другими антигенами. Как правило, связывание антитела с заданным антигеном характеризуется константой диссоциации (K_D) 1×10^{-7} М или менее, например, 1×10^{-8} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 1×10^{-10} М или менее, 1×10^{-11} М или менее или 1×10^{-12} М или менее, как правило, при K_D , что по меньшей мере в десять раз меньше K_D связывания с не специфичным антигеном или эпитопом (например, BSA, казеином). Константа диссоциации может быть измерена стандартными способами. Однако антитела, специфически связывающиеся с заданным антигеном, могут иметь перекрестную реактивность к другим родственным антигенам, например, к такому же заданному антигену от других биологических видов (гомологов), например, человека или обезьяны, например, *Mascara fascicularis* (яванский макак) или *Pan troglodytes* (шимпанзе). Антитела, которые специфически связываются с заданным антигеном могут дополнительно связываться с эпитопом, который делится между дву-

мя или более различными антигенами, такими как интерферон альфа (IFN α) и интерферон омега (IFN ω); то есть антитела вступают в перекрестную реакцию с IFN α и IFN ω .

При использовании в настоящем документе термины "нейтрализующий" или "нейтрализует" и "нейтрализующее антитело" или "антагонист антитела" относятся к антителу или фрагменту антитела, которое частично или полностью ингибирует, при помощи любого механизма, биологическую активность интерферона альфа (IFN α) и/или интерферона омега (IFN ω). Нейтрализующие антитела могут быть идентифицированы при помощи анализов для определения биологической активности IFN α и/или IFN ω , как описано ниже. Антитела нейтрализующие IFN α и/или IFN ω могут ингибировать измеренную биологическую активность IFN α и IFN ω на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

При использовании в настоящем документе термин "интерферон- α " (IFN α) относится ко всем нативным подтипам человеческих интерферонов альфа. Нативный IFN α состоит из более чем 23 тесно связанных подтипов белка, кодируемых различными генами с высокой степенью структурной гомологии (Weissmann and Weber, *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, 33: 251, 1986; Roberts et al., *J. Interferon Cytokine Res.* 18: 805-816, 1998). Подтипами человеческого IFN α являются по меньшей мере IFN α A (IFN α 2) (SEQ ID NO: 5), IFN α B2 (IFN α 8) (SEQ ID NO: 6), IFN α C (IFN α 10) (SEQ ID NO: 7), IFN α D (IFN α 1) (SEQ ID NO: 8), IFN α F (IFN α 21) (SEQ ID NO: 9), IFN α G (IFN α 5) (SEQ ID NO: 10), и IFN α H (IFN α 14) (SEQ ID NO: 11), IFN α I с заменой P34H (IFN α 17) (SEQ ID NO: 12), IFN α J1 (IFN α 7) (SEQ ID NO: 14), IFN α K (IFN α 6) (SEQ ID NO: 14), IFN α 4b (IFN α 4) (SEQ ID NO: 15), и IFN α WA (IFN α 6) (SEQ ID NO: 16). Номенклатура человеческих интерферонов найдена на веб-сайте:

http://www.genenames_org/genefamilies/_IFN.

Термин "IFN ω " в настоящем документе относится к человеческому IFN ω с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 1 и под номером доступа в базе данных UniProt P05000.

Термин "интерферон типа I" относится ко всем нативным подтипам человеческого интерферона- α и одному подтипу интерферона- β , интерферона- ϵ , интерферона- ω и интерферона- κ , которые связываются с общим рецептором интерферона IFNAR.

Термин "IFNAR" в настоящем документе относится к хорошо известному рецептору интерферона, который представляет собой гетеродимер IFNAR1 и IFNAR2. Последовательности белков IFNAR1 и IFNAR2 показаны в SEQ ID NO: 31 и 32, соответственно, зрелый внеклеточный домен IFNAR1 охватывает остатки 28-436 SEQ ID NO: 31, а зрелый внеклеточный домен IFNAR2 охватывает остатки 27-243 SEQ ID NO: 32.

При использовании в настоящем документе термин "антитела" применяется в широком смысле и включает в себя молекулы иммуноглобулина, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела, включая мышинные, человеческие, адаптированные к человеку, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, фрагменты антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, образованные на основе по меньшей мере двух интактных антител или фрагментов антител, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, а также одноцепочечные антитела.

Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно классифицируются на изотипы IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ), в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов.

Термин "фрагменты антител" относится к части молекулы иммуноглобулина, сохраняющей антигенсвязывающий сайт из тяжелой цепи и/или легкой цепи, например, участки, определяющие комплементарность, тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, участки, определяющие комплементарность, легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, вариабельный участок тяжелой цепи (VH) или вариабельный участок легкой цепи (VL). Фрагменты антител включают в себя хорошо известные фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd и Fv, а также доменные антитела (dAb), содержащие один домен VH. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конструкций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессированы в отдельных одноцепочечных конструктах антител, с образованием одновалентного антигенсвязывающего сайта, например, одноцепочечного Fv (scFv) или диантитела; описаны, например, в международной патентной публикации № WO1998/44001, международной патентной публикации № WO1988/01649; международной патентной публикации № WO1994/13804, международной патентной публикации № WO1992/01047.

Вариабельный участок антитела состоит из "каркасного" участка, разделенного тремя "антигенсвязывающими сайтами". Антигенсвязывающие сайты определены с помощью различных терминов: (i) участки, определяющие комплементарность (CDR) три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3) - основаны на вариабельности последовательности (Wu and Kabat, *J Exp Med* 132:211-50, 1970; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National

Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991); (ii) "гипервариабельные участки", "HVR" или "HV", три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относятся к участкам вариабельных доменов антитела, являющихся по своей структуре гипервариабельными, согласно определению Чотиа и Леск (Chothia and Lesk, Mol. Biol. 196:901-17, 1987). К другим терминам относятся IMGT-CDR (Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003) и "используемые остатки, определяющие специфичность" (SDRU) (Almagro Mol Recognit 17:132-43, 2004). В базе данных International ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) представлена стандартизованная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между границами CDR, HV и IMGT описано в публикации Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003.

"Остатки по Chothia" в настоящем документе представляют собой остатки антитела VL и VH с нумерацией в соответствии с Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273:927-48, 1997).

"Каркасный участок" или "каркасные последовательности" относятся к последовательностям вариабельного участка, которые не были определены как антигенсвязывающий сайт. Поскольку для определения антигенсвязывающего сайта могут использоваться разные термины, как описано выше, определение точной аминокислотной последовательности каркасного участка зависит от определения антигенсвязывающего сайта.

Термин "человеческое антитело" или "полностью человеческое антитело" относится к антителу, содержащему последовательности вариабельных участков и константных участков, полученные из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. Человеческие антитела настоящего изобретения могут включать в себя замены, т. е. они могут не быть точными копиями экспрессируемого человеческого иммуноглобулина или зародышевых генных последовательностей. Однако антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены от видов, отличных от человека, не подходят под определение "человеческих антител".

Термины "адаптированные к человеку" антитела или "адаптированные к человеческому каркасу" (HFA) антитела относятся к антителам, адаптированным в соответствии со способами, описанными в патентной публикации США № US2009/0118127, а также относятся к антителам, в которых последовательности антигенсвязывающих сайтов получены от видов, отличных от человека, и трансплантированы на человеческие каркасы.

Термин "гуманизированные антитела" относится к антителам, у которых антигенсвязывающие сайты получены от видов, отличных от человека, а каркасы вариабельных участков получены от последовательностей человеческих иммуноглобулинов.

Гуманизированные антитела могут включать замены в каркасных участках, в результате чего каркас может не быть точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или зародышевых генных последовательностей.

Термин "моноклональное антитело" в настоящем документе означает препарат молекул антитела одномолекулярной композиции. Композиция моноклональных антител отображает одну специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу.

Термин "по существу идентичный" в настоящем документе означает, что аминокислотные последовательности двух сравниваемых вариабельных участков антител идентичны или имеют "несущественные отличия". Несущественные отличия представляют собой замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 аминокислот в последовательности антитела или вариабельного участка антитела, не оказывающего отрицательного воздействия на свойства антитела. Аминокислотные последовательности, по существу идентичные последовательностям вариабельного участка, описанным в настоящем документе, входят в объем настоящей заявки. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей может составлять приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше. Идентичность, определенная в процентном соотношении, может быть вычислена, например, при попарном выравнивании с помощью настройки, заданной по умолчанию, в модуле AlignX программного обеспечения Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния). Белковые последовательности настоящего изобретения можно использовать в качестве искомой последовательности при выполнении поиска в общедоступных или патентованных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Примерами программ, используемых для выполнения таких поисков, являются программы XBLAST или BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) или пакет GenomeQuest™ (GenomeQuest, г. Вестборо, штат Массачусетс, США) с использованием настроек по умолчанию.

Термин "эпитоп" в настоящем документе означает часть антигена, с которым специфически связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (например, полярных, неполярных или гидрофобных) поверхностных группировок остатков, например, боковых цепей аминокислот или

полисахаридов, и они могут иметь специфические особенности трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из смежных и/или несмежных аминокислот, образующих конформационный пространственный блок. В случае несмежного эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в трехмерном пространстве благодаря сворачиванию молекулы белка.

Используемый в настоящем документе термин "паратоп" означает часть антитела, с которой специ-

фически связывается антиген. Паратоп может быть линейным или дискретным, образованным за счет пространственных взаимоотношений между аминокислотами, не находящимися в непрерывной последовательности, в отличие от взаимодействия линейно связанных аминокислот. Термины "паратоп легкой цепи" и "паратоп тяжелой цепи", или "аминокислотные остатки паратопа легкой цепи" и "аминокислотные остатки паратопа тяжелой цепи" означает аминокислотные остатки легкой и тяжелой цепей, контактирующие с антигеном.

При использовании в настоящем документе термин "биспецифический" относится к антителу, которое связывает два разных антигена или два разных эпитопа одного антигена. Биспецифические антитела могут связывать два или несколько разных антигенов в случаях, когда биспецифические антитела вступают в перекрестную реакцию с IFN α и IFN ω .

При использовании в настоящем документе термин "моноспецифический" относится к антителу, связывающему один антиген или один эпитоп. Моноспецифические антитела могут связывать два или несколько разных антигенов в случаях, когда моноспецифические антитела вступают в перекрестную реакцию с IFN α и IFN ω .

При использовании в настоящем документе термин "в комбинации с" означает, что описанные агенты можно вводить совместно в смеси, одновременно в качестве отдельных агентов или последовательно в качестве отдельных агентов в любом порядке.

Термины "биологическая активность IFN α " и "биологическая активность IFN ω " в настоящем документе относятся к любой активности, возникающей в результате связывания IFN α и IFN ω , соответственно, со своим рецептором IFNAR. Одна биологическая активность IFN α и IFN ω представляет собой способность IFN α и IFN ω индуцировать экспрессию секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого интерфероном промотора ISG54 в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции 2 (STAT2), регуляторный фактор интерферона 9 (IRF9) и SEAP при помощи стандартных способов. Другая биологическая активность IFN α и IFN ω представляет собой индукцию выработки хемокина IP-10 (CXCL10) из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMCs) или цельной крови, как описано в настоящем документе.

Таблица 1

Аминокислота	Трехбуквенный код	Однобуквенный код
Аланин	Ала	A
Аргинин	Арг	R
Аспарагин	Асн	N
Аспарагиновая кислота	Асп	D
Цистеин	Цис	C
Глутаминовая кислота	Глу	E
Глутамил	Глн	Q
Глицин	Гли	G
Гистидин	Гис	H
Изолейцин	Иле	I
Лейцин	Лей	L
Лизин	Лиз	K
Метионин	Мет	M
Фенилаланин	Фен	F
Пролин	Про	P
Серин	Сер	S
Треонин	Тре	T
Триптофан	Три	W
Тирозин	Тир	Da
Валин	Вал	V

Термин "вектор" означает полинуклеотид, способный к воспроизведению внутри биологической системы или который можно переместить между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или маркеры выбора, обеспечивающие воспроизведение или сохранение таких полинуклеотидов в биологической системе. Примеры таких биологических систем могут включать клетку, вирус, животное, растение и реконструированные биологические системы, использующие биологические компоненты, способные к удвое-

нию вектора. Содержащий вектор полинуклеотид может представлять собой молекулы ДНК или РНК или их гибрид.

Термин "вектор экспрессии" означает вектор, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для прямой трансляции полипептида, закодированного полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в векторе экспрессии.

Термин "полинуклеотид" означает молекулу, содержащую цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. Двухцепочечные и одноцепочечные молекулы ДНК и РНК представляют собой типичные примеры полинуклеотидов.

Термин "полипептид" или "белок" обозначает молекулу, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться "пептидами".

В настоящем изобретении использованы общепринятые одно- и трехбуквенные коды обозначения аминокислот, как показано в табл. 1.

Композиции настоящего изобретения

В настоящем изобретении описываются моноклональные антитела, которые связываются с и нейтрализуют активность человеческого интерферона омега ($IFN\omega$) и множества подтипов человеческого интерферона альфа ($IFN\alpha$) (антитела к $IFN\alpha/\omega$). Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на идентификации минимально нейтрализующего эпитопа, который делится $IFN\omega$ и множеством подтипов $IFN\alpha$, с которым связываются антитела к $IFN\alpha/\omega$ по данному изобретению. Антитела к $IFN\alpha/\omega$ по данному изобретению обладают большей активностью в нейтрализации препаратов, подходящих для лечения СКВ, IFN типа I и характерных признаков IFN , чем антитела, нейтрализующие подтипы $IFN\alpha$, но не $IFN\omega$, и, следовательно, могут быть более эффективны в лечении любых заболеваний, связанных с увеличением выработки $IFN\alpha$ и $IFN\omega$, таких как иммунноопосредованные воспалительные заболевания. Поскольку антитела к $IFN\alpha/\omega$ по данному изобретению не нейтрализуют $IFN\beta$, они могут иметь более благоприятные профили безопасности и ФК по сравнению с методами терапии при помощи анти- $IFNAR$, которые, как ожидается, должны блокировать все интерфероны типа I. Термин "антитела к $IFN\alpha/\omega$ " в настоящем документе относится к антителам, которые связываются с и нейтрализуют $IFN\omega$ и множество подтипов $IFN\alpha$, как приведено в примерах в данном документе.

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой моноклональное антитело, которое связывается с и нейтрализует активность человеческого интерферона омега ($IFN\omega$) и по меньшей мере четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти подтипов человеческого интерферона альфа ($IFN\alpha$).

Антитела по изобретению могут нейтрализовать подтипы $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$ и $IFN\alpha J1$. Антитела по изобретению могут нейтрализовать подтипы $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha C$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$ и $IFN\alpha J1$. Антитела по изобретению могут нейтрализовать подтипы $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha C$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$, $IFN\alpha J1$ и $IFN\alpha A$. Антитела по изобретению могут нейтрализовать подтипы $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha C$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$, $IFN\alpha J1$, $IFN\alpha A$ и $IFN\alpha H2$. Антитела по изобретению могут нейтрализовать подтипы $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha C$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$, $IFN\alpha J1$, $IFN\alpha A$, $IFN\alpha H2$ и $IFN\alpha K$. Антитела по изобретению могут нейтрализовать подтипы $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha C$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$, $IFN\alpha J1$, $IFN\alpha A$, $IFN\alpha H2$, $IFN\alpha K$ и $IFN\alpha$. Антитела по изобретению могут нейтрализовать подтипы $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha C$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$, $IFN\alpha J1$, $IFN\alpha A$, $IFN\alpha H2$, $IFN\alpha K$, $IFN\alpha WA$ и $IFN\alpha 4a$.

Антитела по изобретению могут быть протестированы на их способность нейтрализовать $IFN\alpha$ и $IFN\omega$ в ходе анализа с использованием гена-репортера при помощи клеточных линий, экспрессирующих гены-репортеры под действием промотора, реагирующего на интерферон, и при помощи стимулирования клеток различными подтипами $IFN\alpha$ и/или $IFN\omega$. Например, клетки HEK-Blue™ $IFN-\alpha/\beta$ cells (InvivoGen, г. Сан-Диего, штат Калифорния), полученные для экспрессии сигнального пути полностью активного IFN типа I (стабильно экспрессирующего STAT2 и IRF9), а также трансфицированные геном-репортером SEAP под контролем индуцируемого $IFN\alpha/\beta$ промотора ISG54, могут быть использованы, как описано в настоящем документе. Сигнал от щелочной фосфатазы может быть обнаружен при помощи хорошо известных реагентов и сигнал может быть считан на спектрофотометре, а также можно рассчитывать IC_{50} для ингибирования при помощи стандартных способов.

В одном варианте осуществления антитела по изобретению ингибируют активность человеческого $IFN\omega$ со значением IC_{50} около 5×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, или около 1×10^{-12} М или менее, а также ингибирует активность подтипов $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$ или $IFN\alpha J1$ со значением IC_{50} около 5×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, или около 1×10^{-12} М или менее, когда активность человеческого $IFN\omega$ и подтипов человеческого интерферона $IFN\alpha$ представляет собой ингибирование экспрессии секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого интерфероном промотора ISG54 в клет-

ках HEK293, стабильно экспрессирующих сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции 2 (STAT2), регуляторный фактор интерферона 9 (IRF9) и SEAP. Антитела по изобретению "нейтрализуют" IFN ω и/или любой подтип IFN α , если значение IC₅₀ около 5×10^{-8} или менее, например, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, или около 1×10^{-12} М или менее при анализе "гена-репортера ISRE", как описано в настоящем документе в примере 3.

Антитела по изобретению также могут быть протестированы на их способность нейтрализовать IFN α и IFN ω путем оценки их способности ингибировать IFN-индуцированное высвобождение цитокинов, такое как высвобождение IP-10 из IFN-индуцированных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или цельной крови. Например, МКПК выделяют из гепаринизированной цельной крови здоровых добровольцев при помощи стандартных протоколов, которые получают лечение предварительно образованным комплексом IFN и антитела, которые будут протестированы, и высвобождение IP-10 измеряют при помощи стандартных способов, таких как набор цитокинов/хемокинов Milliplex (Millipore, Premixed 39 plex). Антитела нейтрализующие IFN α и IFN ω могут ингибировать высвобождение IP-10 по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению с IFN-индуцированным высвобождением IP-10 при отсутствии антитела.

Антитела по изобретению могут связывать и нейтрализовать по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять подтипов IFN α в дополнение к нейтрализации IFN ω . Подтипы IFN α и IFN ω могут быть получены путем рекомбинантной экспрессии при помощи стандартных способов. Примеры сигнальных последовательностей, которые могут быть использованы для направления секреции показаны в SEQ ID NO: 17-21.

Антитела по данному изобретению связывают IFN ω с константой диссоциации (K_D) около 5×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 5×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 5×10^{-11} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, около 5×10^{-12} М или менее, или около 1×10^{-12} М или менее, а также связывают подтипы человеческого IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G или IFN α J1 со значением K_D около 5×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 5×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 5×10^{-11} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, около 5×10^{-12} М или менее, или около 1×10^{-12} М или менее.

Аффинность антител к IFN ω или подтипам IFN α можно определить экспериментально с использованием любого подходящего способа. Такие способы могут включать в себя ProteOn XPR36, использование инструментов Biacore 3000 или KinExA, ИФА или способов конкурентно-связывающего анализа, известных специалистам в данной области. Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре антитело/IFN ω или подтипы IFN α может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, K_D , K_{on} , K_{off}) предпочтительно осуществлять с использованием стандартизированных условий и стандартизированного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем документе. Специалисту в данной области будет понятно, что внутренняя ошибка измерения аффинности, например, с использованием Biacore 3000 или ProteOn (измеряемая как стандартное отклонение, CO), как правило, может составлять 5-33% для измерений, проводимых в границах типичных пределов детекции. Следовательно, термин "приблизительно" отражает типичное стандартное отклонение в анализе. Например, типичное CO для K_D 1×10^{-9} М составляет до $\pm 0,33 \times 10^{-9}$ М.

Антитела, связывающие человеческий IFN ω и подтипы IFN α с желаемой аффинностью и профилем нейтрализации можно выбрать из библиотек вариантов или фрагментов при помощи разделения методом пэннинга с человеческим IFN ω и подтипами IFN α и необязательно с использованием дополнительного созревания аффинности антител. В процедуре разделения примеров методом пэннинга, фаговые библиотеки можно последовательно разделить методом пэннинга или при помощи смеси IFN ω шимпанзе, и подтипов человеческого IFN α IFN α 2, IFN α 1, IFN α H2, IFN α G и IFN α F. Кроме того, антитела по настоящему изобретению можно получить путем иммунизации мышей IFN ω шимпанзе и яванского макака, подтипов человеческого IFN α IFN α D, IFN α J1, IFN α C, IFN α B2, IFN α H2, IFN α A, IFN α 4a, IFN α G, IFN α F, IFN α WA и IFN α I, а также скрининга гибридом при помощи стандартных способов.

Антитела можно идентифицировать с помощью подходящего способа на основе их способности ингибировать биологическую активность IFN ω и IFN α при помощи любого подходящего способа и способов, описанных в настоящем документе.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является выделенное моноклональное антитело, которое связывается с и нейтрализует активность человеческого интерферона омега (IFN ω) и по меньшей мере четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти подтипов человеческого интерферона альфа (IFN α), причем антитело конкурирует за связывание с человеческим IFN ω и подтипами человеческого IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G или IFN α J1 с выделенным антителом, содержащим:

вариабельный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 и вариабельный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24; или

VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28.

Конкуренцию за специфическое связывание с человеческим IFN ω и подтипами человеческого IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 между антителами настоящего изобретения, содержащими определенные последовательности VH и VL, можно анализировать *in vitro* с использованием хорошо известных способов. Например, связывание меченных сложным эфиром NHS под названием MSD Sulfo-TagTM антител с человеческим IFN ω и подтипами человеческого IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G или IFN α J1 в присутствии немеченных антител можно анализировать методами ИФА или Biacore, или для демонстрации конкуренции с антителами настоящего изобретения можно использовать метод проточной цитометрии. Кроме того, можно использовать метод немеченного конкурентно-связывающего анализа в режиме реального времени при помощи набора Octet (ForteBio, Менло-Парк, Калифорния), как описано в настоящем документе. Способность испытуемого антитела ингибировать связывание антитела, содержащего VH с последовательностью SEQ ID NO 23 и VL с SEQ ID NO: 24 или VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 28, с человеческим IFN ω и подтипами человеческого IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 показывает, что испытуемое антитело конкурирует с этими антителами за связывание с человеческим IFN ω и подтипами человеческого IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело по изобретению связывается с IFN ω на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело по изобретению связывается с IFN α 4a на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 19.

Остатки F27, L30 и R33 как в IFN ω , так и в IFN α 4a определяют минимальный эпитоп, необходимый для широкой нейтрализации активности антител к IFN α/ω по изобретению. Кристаллическая структура нескольких комплексов антитело/IFN α или антитело/IFN ω выявила три остатка, обеспечивающие преобладающее влияние на связывание антител. Человеческий IFN α 4a проявляет схожую по меньшей мере на 83% идентичность с другими человеческими IFN α и 59% идентичности с человеческим IFN ω . Остаток F27 сохраняется во всех человеческих IFN α , кроме IFN α D (α 1). F27 также сохраняется в человеческом IFN ω . Как L30, так и R33 сохраняются во всех человеческих IFN α , а также в человеческом IFN ω .

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, моноклональное антитело по изобретению, которое связывается с и нейтрализует активность человеческого интерферона омега (IFN ω) и по меньшей мере четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти подтипов человеческого интерферона альфа (IFN α), не связывает и не нейтрализует IFN α D.

Антитела по изобретению, связывающие конкретные остатки IFN ω и IFN α можно получать путем иммунизации мышей, экспрессирующих локусы человеческого иммуноглобулина (Lonberg et al., Nature 368:856-9, 1994; Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51, 1996; Mendez et al., Nature Genetics 15:146-56, 1997, патенты США №№ 5,770,429, 7,041,870 и 5,939,598) или мышей Balb/c пептидами, содержащими остатки контакта с эпитопами, например, пептидом, имеющим аминокислотную последовательность петли AB IFN ω (аминокислотные остатки 22-34 FN ω с SEQ ID NO: 1) или петли AB IFN α 4a (аминокислотные остатки 22-34 IFN α 4a с SEQ ID NO: 19), или смесь IFN ω и подтипов IFN α , как описано в настоящем документе, а также с использованием гибридного метода, Kohler et al., Nature 256:495-97, 1975. Полученные антитела тестируются на способность к конкурированию с антителами по настоящему изобретению, такими как антитела, имеющие VH с SEQ ID NO: 23 и VL с SEQ ID NO: 24 и тестируют на их связывание с эпитопом с помощью стандартных способов. Например, в случае, когда известны структуры обоих отдельных компонентов, можно использовать анализ *in silico* прикрепления одного белка к другому белку для идентификации способов к взаимодействию участков. Может быть проведено избирательное замещение водорода дейтерием (H/D) в комплексе антигена и антитела с целью картирования участков антигена, способных связываться с антителом. Сегментный и точечный мутагенез антигена можно использовать для определения местоположения важных для связывания с антителом аминокислот. Со-кристаллическая структура комплекса антиген-антитело может использоваться для идентификации остатков, участвующих в образовании эпитопа и паратопа. Идентифицированные mAb можно дополнительно модифицировать путем включения измененных вспомогательных каркасных остатков с сохранением аффинности связывания, с использованием способов, описанных, например, в публикациях Queen et al., Proc Natl Acad Sci (USA) 86:10029-32, 1989 г., и Hodgson et al., Bio/Technology 9:421, 1991.

В другом варианте осуществления антитело по изобретению связывается с IFN ω на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33, а также дополнительно связывается по меньшей мере с одним остатком IFN ω , выбранным из группы, состоящей из остатков P26, K31 и R34 с SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления антитело по изобретению связывается с IFN ω на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33, а также дополнительно связывается по меньшей мере с одним остатком IFN ω , выбранным из группы, состоящей из остатков R22, R23, I24, S25, P26, K31, D32, R34, D35, Q40, K134, M146, E147, M149, K150, F153 и L154 с SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления антитело по изобретению связывается с IFN ω с SEQ ID NO: 1 на

одном или нескольких остатках R22, P26, F27, L30, K31, D32, R33, R34, D35, Q40, K134, M146, E147, M149, K150, F153 и L154.

В другом варианте осуществления антитело по изобретению связывается с IFN ω с SEQ ID NO: 1 на одном или нескольких остатках R23, I24, S25, P26, F27, L30, K31, R33, R34, M146, E147, M149 и K150.

В другом варианте осуществления антитело по изобретению связывается с IFN α 4a на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33, а также дополнительно связывается по меньшей мере с одним остатком IFN α 4a, выбранным из группы, состоящей из остатков H26, K31 и R34 с SEQ ID NO: 19.

В другом варианте осуществления антитело по изобретению связывается с IFN α 4a на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33, а также дополнительно связывается по меньшей мере с одним остатком IFN α 4a, выбранным из группы, состоящей из остатков A19, H26, F27, L30, K31, D32, R33, H34, D35, V143, A146, E147, M149, R150 и S153 с SEQ ID NO: 19.

В другом варианте осуществления антитело по изобретению связывается с IFN α 4a с SEQ ID NO: 19 на одном или нескольких остатках A19, H26, F27, L30, K31, D32, R33, H34, D35, V143, A146, E147, M149, R150 и S153 с SEQ ID NO: 19.

В другом варианте осуществления антитело по изобретению связывается с IFN α 4a с SEQ ID NO: 19 на одном или нескольких остатках G22, R23, I24, S25, H26, F27, C29, L30, K31, R33, H34 V143, A146, E147 и R150, а также S153 с SEQ ID NO: 19.

В других вариантах осуществления антитела по изобретению ингибируют активность индуцированного вирусом лейкоцитарного интерферона.

В некоторых вариантах осуществления активность индуцированного вирусом лейкоцитарного интерферона представляет собой высвобождение IP-10 в цельной крови, индуцированного 100 Ед/мл интерферона.

Антитела по изобретению могут нейтрализовать интерферон, продуцируемого активированными лейкоцитами, по оценке их способности ингибировать высвобождение IP-10 в цельной крови, индуцированной 100 Ед/мл интерферона, как описано в настоящем документе. Антитела по изобретению могут нейтрализовать эффекты интерферона, продуцируемого активированными лейкоцитами по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% в присутствии 50 мкг/мл антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению ингибируют высвобождение IP-10 в цельной крови более чем на 50% в присутствии 50 мкг/мл антитела.

В другом варианте осуществления антитела по изобретению ингибируют выработку IFN, индуцированную иммунным комплексом системной красной волчанки (СКВ). Иммунный комплекс СКВ представляет собой среду IFN типа I среде, которая присутствует в СКВ. Выработку ИФН можно измерить с помощью анализа гена-репортера, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению могут ингибировать выработку IFN, индуцированную иммунным комплексом СКВ по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Антитела по изобретению могут быть человеческими, гуманизированными или адаптированными к человеку.

Антитела по настоящему изобретению могут относиться к типу IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. Антитела по настоящему изобретению могут относиться к типу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 и переменный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24; VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26; или VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28.

Человеческие mAb, в которых отсутствуют последовательности, не свойственные человеку, можно получить и оптимизировать из библиотек фаговых дисплеев с помощью способов, описанных, например, в работах Knappik et al., J Mol Biol 296:57-86, 2000; и Krebs et al., J Immunol Meth 254:67-84 2001. В способе, приведенном в качестве примера, антитела настоящего изобретения были выделены из библиотек экспрессией переменных участков тяжелой и легкой цепи в виде слитого белка с белком оболочки рIX бактериофага. В библиотеках антител был проведен скрининг на связывание с человеческим IFN ω и IFN α , а затем полученные позитивные клоны были дополнительно охарактеризованы, из лизатов клонов были выделены Fab, и затем выполнена экспрессия полноразмерных IgG. Примеры библиотек антител и способов скрининга представлены в публикациях Shi et al., J Mol Biol 397:385-96, 2010; международная патентная публикация № WO2009/085462 и США № 12/546850; патенты США №№ 5,223,409, 5,969,108 и 5,885,793).

Полученные mAb можно дополнительно модифицировать в их каркасных участках с изменением определенных каркасных остатков до остатков, присутствующих в соответствующей человеческой зародышевой линии.

Иммуноэффекторные свойства антител, раскрываемых в настоящем изобретении, также могут быть усилены или ослаблены за счет модификаций Fc-фрагмента с применением способов, хорошо известных специалистам. Например, эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, уменьшение числа рецепторов на поверхности клетки (например, В-клеточного рецептора; BCR) и т.п., можно обеспечивать и/или контролировать путем модификации остатков в Fc, отвечающих за эти функции. Мутировавшие остатки в Fc-домене, увеличивающие полужизнь антител, могут также улучшить фармакокинетические свойства (Strohl "Curr Opin Biotechnol" 20:685-91, 2009).

Кроме того антитела, раскрываемые в настоящем изобретении, могут быть модифицированы на пост-трансляционно за счет таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или ненатуральная ковалентная модификация, такая как присоединение нативной молекулы полиэтиленгликоля (пегилирование) или липидизация. Такие модификации могут происходить в условиях *in vivo* или *in vitro*. Например, антитела, раскрываемые в настоящем изобретении, могут быть конъюгированы с полиэтиленгликолем (ПЕГилированы) с целью улучшения их фармакокинетических профилей. Конъюгация может быть выполнена с помощью способов, известных специалистам в данной области. Отмечено, что конъюгация терапевтических антител с ПЭГ улучшает фармакодинамику, не оказывая влияния на функцию (Knigh, et al. "Platelets" 15:409-18, 2004, Leong, et al. Cytokine 16:106-19, 2001, Yang, et al. Protein Eng 16:761-70, 2003).

Антитела или их фрагменты, составляющие предмет настоящего изобретения, модифицированные с целью улучшения стабильности, селективности, перекрестной реактивности, аффинности, иммуногенности или достижения других желательных биологических или биосептических характеристик, также являются частью настоящего изобретения. Стабильность антитела определяется рядом факторов, включая (1) пространственную укладку индивидуальных доменов, влияющую на их естественную стабильность, (2) поверхностное взаимодействие белков, определяющее спаривание HC и LC, (3) глубину расположения полярных и заряженных остатков, (4) сеть водородных мостиков между полярными и заряженными остатками; и (5) поверхностный заряд и распределение полярных остатков наряду с другими внутри- и межмолекулярными взаимодействиями (Worn et al., J. Mol Biol 305:989-1010, 2001). Аминокислотные остатки, способные дестабилизировать структуру, могут быть идентифицированы на основании кристаллической структуры антитела или путем молекулярного моделирования, а эффект определенных аминокислотных остатков на стабильность антитела может быть проверен путем создания мутаций и оценки их влияния. Один из способов увеличения стабильности антитела заключается в увеличении срединной точки термперехода (T_m), измеряемой путем дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Как правило, T_m белка имеет положительную корреляцию с его стабильностью и отрицательную корреляцию с подверженностью к нарушениям третичной структуры и денатурации в растворах, а также деградации, которая зависит от склонности белка к нарушению третичной структуры (Remmele et al., Biopharm 13:36-46, 2000). Ряд исследований свидетельствует о корреляции между степенью физической стабильности составов, измеренной как термостабильность путем ДСК, и измерениями, проведенными с помощью других способов (Gupta et al., AAPS PharmSci 5E8, 2003; Zhang et al., J Pharm Sci 93:3076-89, 2004; Maa et al., Int J Pharm 140:155-68, 1996; Bedu-Addo et al., Pharm Res 21:1353-61, 2004; Remmele et al., Pharm Res 15:200-8, 1997). Результаты исследований состава позволяют предположить, что T_m Fab-фрагмента влияет на долговременную физическую стабильность соответствующего mAb. Различия в аминокислотах либо каркасного фрагмента, либо в CDR-участках могут существенно влиять на термическую стабильность домена Fab (Yasui et al., FEBS Lett 353:143-6, 1994).

Антитела к IFN α/ω по изобретению можно получить в виде биспецифических антител, которые также входят в объем настоящего изобретения. Из участков VL и/или VH антител настоящего изобретения с использованием опубликованных способов можно получить одноцепочечные биспецифические антитела в виде структур, таких как структуры TandAb® (международная патентная публикация № WO1999/57150; публикация патента США № US2011/0206672), или биспецифические scFV в виде структур, таких как описанные в патенте США № 5,869,620; международной патентной публикации № WO1995/15388A, международной патентной публикации № WO1997/14719 или международной патентной публикации № WO2011/036460.

Из участков VL и/или VH антител настоящего изобретения можно получить биспецифические полноразмерные антитела, где каждое плечо антитела связывается со своим антигеном или эпитопом. Такие биспецифические антитела, как правило, получают модулированием взаимодействий СНЗ между двумя тяжелыми цепями антител с образованием биспецифических антител посредством таких способов, как описанные в патенте США № 7,695,936; международной патентной публикации № WO04/111233; публикации патента США № US2010/0015133; публикации патента США № 2007/0287170, международной патентной публикации № WO2008/119353; публикации патента США № US2009/0182127; публикации патента США № US2010/0286374; публикации патента США № US2011/0123532, международной патентной публикации № WO2011/131746, международной патентной публикации № WO2011/143545; или публикации патента США № US2012/0149876. Дополнительными биспецифическими структурами, в

которые могут встраиваться участки VL и/или VH антител настоящего изобретения, являются, например, иммуноглобулины с двойными переменными доменами (международная патентная публикация № WO2009/134776) или структуры, включающие в себя различные димеризационные домены для соединения двух обладающих разной специфичностью плеч антител, например "лейциновую застежку" или коллагеновые димеризационные домены (международная патентная публикация № WO2012/022811, патент США № 5,932,448; патент США № 6 833 441).

Другим аспектом настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий любой из переменных участков тяжелой цепи антитела или переменных участков легкой цепи настоящего изобретения или их фрагменты, либо их комплемент. Принимая во внимание вырожденность генетического кода или предпочтительность использования кодонов в данной экспрессионной системе, полинуклеотиды, кодирующие предложенные антитела, раскрываемые в настоящем изобретении, также входят в объем настоящего изобретения.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой вектор, содержащий полинуклеотид настоящего изобретения. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы, вирусные векторы, векторы для экспрессии бакуловируса, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, подходящие для введения полинуклеотидов настоящего изобретения в данный организм или генетическое окружение каким-либо образом.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид настоящего изобретения. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, бактериальные, растительные клетки или клетки архей. Примерами эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают immortalized клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например, SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, США, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580) мышиные клеточные линии. Обычно используется линия клеток миеломы человека U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие полезные клеточные линии включают линии, полученные из яичников китайского хомячка (CHO), например, линии CHO-K1SV (Lonza Biologics, г. Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в способе получения антител, включающем культивирование предложенных в настоящем изобретении клеток-хозяев, и отборе антител, производимых клетками-хозяевами. Способы создания и очистки антител хорошо известны специалистам в данной области.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ ингибирования взаимодействия IFN ω и подтипов IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 с IFNAR у требующего лечения пациента, включающее введение выделенного антитела, которое конкурирует за связывание с человеческим IFN ω и подтипами человеческого IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 с выделенным антителом, содержащим: переменный участок тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 23 и переменный участок легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 24; или VH с SEQ ID NO: 27 и VL SEQ ID NO: 28 пациенту в течение времени, достаточного для предотвращения взаимодействия IFN ω и подтипов IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 с IFNAR. Конкуренцию между антителом и IFNAR можно проанализировать с использованием стандартных способов и способов, описанных в данном документе, при помощи, например, внеклеточных участков IFNAR1 (SEQ ID NO: 31) и IFNAR2 (SEQ ID NO: 32) или их слитые белки Fc fusion.

Способы лечения

Антитела к IFN α/ω по настоящему изобретению можно использовать для лечения или профилактики любого заболевания, связанного с повышенной выработкой IFN α и IFN ω . При реализации способов, являющихся объектом изобретения, можно использовать антитело к IFN α/ω по изобретению. Кроме того, любое антитело, конкурирующее за связывание с человеческим IFN ω и подтипами человеческого IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 с выделенным антителом, содержащим переменный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 и переменный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24; или VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28 могут быть использованы.

Кроме того, любое антитело, которое связывается с IFN ω на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 1 и IFN α 4a на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 19 может быть использовано.

Способы настоящего изобретения можно использовать для лечения любого пациента-животного в рамках любой классификации. Примеры таких животных включают млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные. Например, антитела по изобретению можно использовать для профилактики и лечения иммуноопосредуемых воспалительных заболеваний, таких

как системная красная волчанка (СКВ), диабет 1-го типа, псориаз, первичный синдром Шегрена, системный склероз, ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК; включая болезнь Крона, язвенный колит и целиакия), иммуноопосредованный воспалительный тиреоидит и гломерулонефрит. Кроме того, композиции антител данного изобретения можно использовать для ингибирования или предотвращения отторжения трансплантата или для лечения реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD).

Антитела настоящего изобретения также пригодны для получения препаратов для лечения таких состояний, при этом препараты для лечения приготовлены для введения в дозировках, определенных в настоящем документе.

Не вдаваясь в конкретную теорию, полагают, что триггеры СКВ, такие как иммунные комплексы, вызванные ответами IFN типа I, включая IFN α и IFN ω , но не IFN β . Таким образом, антитела к IFN α/ω по изобретению могут обеспечить более эффективное лечение СКВ посредством широкого ингибирования этих патогенных интерферонов типа I, не затрагивая функцию IFN β , что может играть более важную роль в противовирусной защите. В рамках настоящего изобретения были получены антитела, широко нейтрализующие IFN α/ω , а также был идентифицирован уникальный нейтрализующий эпитоп, присутствующий в IFN α и IFN ω , несмотря на задачи, учитывая предположение, что IFN α и IFN ω уникальны по антигенам (Adolf, J Gen Virol 68:1669-1676, 1987).

Связь между IFN α и СКВ впервые была описана в 1979 г., когда данный цитокин показал повышение уровня в сыворотке крови пациентов с СКВ (Hooks et al., N Engl J Med 301:5-8, 1979; Preble et al., Science 216:429-431, 1982). Совсем недавно, характерные признаки генов типа IFN типа I были подробно описаны в подгруппе пациентов с СКВ и степень экспрессии характерных признаков IFN, как сообщается, положительно коррелирует как с клиническими, так и с серологическими признаками заболевания (Karageorgas et al., J Biomed Biotechnol 273907, 2011; Baechler et al., Proc Natl Acad Sci USA 100:2610-2615, 2003; Bennett et al., J Exp Med 197:711-723, 2003; Dall'era et al., Ann Rheum Dis 64: 1692-1697, 2005; Niewold et al., Genes Immun 8: 492-502, 2007). Несколько исследований генетической ассоциации указали потенциальную роль для пути IFN типа I путь в опосредовании заболевания у некоторых пациентов с волчанкой (Delgado-Vega et al., Arthritis Res Ther 12 Suppl 1 S2; Elkon and Stone; J Interferon Cytokine Res 11:803-812, 2011). Дальнейшие исследования выявили, что IFN α модулирует экспрессию набора генных продуктов, связанные с патогенными механизмами в СКВ. Например, IFN α может индуцировать экспрессию BlyS важного фактора выживания В-клеток, а также цель Benlysta® (белimumаба). Существует положительная корреляция с активностью IFN типа I и уровнями растворимого BlyS у пациентов с СКВ (Ritterhouse et al., Arthritis Rheum 63:3931-3941, 2011), и блокированием IFN α у пациентов с СКВ, что привело к снижению экспрессии генов BlyS при биопсии поврежденной кожи небольшого числа пациентов с СКВ, у которых брали образцы ткани (Yao et al., Arthritis Rheum 60:1785-1796, 2009). В сочетании с IL-6 также была показана важность IFN α для генерации Ig-секретирующих плазматических клеток (Jego et al., Curr Dir autoimmune 8:124-139, 2005). Помимо прямого воздействия на компартмент В-клеток IFN α имеет воздействие на другие важные медиаторы патогенеза волчанки. Blanco et al. продемонстрировали, что IFN α может индуцировать дифференцировку моноцитов до ДК, представляющих антиген (Blanco et al., Science 294:1540-1543, 2001). Нейтрализация IFN α , присутствующего в образцах сыворотки с СКВ значительно понизила способность сыворотки СКВ индуцировать моноциты к дифференциации ДК, демонстрируя важную роль этого цитокина в снижении терпимости к собственным антигенам у некоторых пациентов с СКВ. Терапия IFN α по вирусным или онкологическим показаниям у некоторых пациентов показала возможность индуцирования заболевания, схожего с СКВ, которое исчезало после прекращения терапии (Burdick et al., Expert Opin Drug Saf 8:459-472, 2009; Biggioggero et al., Autoimmunity 43:248-254, 2010).

IFN быстро вырабатывается в ответ на инфекционные агенты, такие как вирусы, чтобы контролировать инфекцию.

Предполагается, что аутоантитела, связанные с лигандами нуклеиновых кислот, являются преобладающими индукторами IFN типа I в СКВ. Преобладание аутоантител в сочетании с нарушенным клиренсом аутоантигенов приводит к циклу обратной связи выработки IFN, в котором интернализация, зависящая от Fc рецептора иммунных комплексов в плазматическоидные дендритные клетки (pDC) приводит к увеличению количества IFN и таким образом, к образованию характерных признаков IFN. Рецепторы нуклеиновых кислот, такие как Toll-подобные рецепторы (TLR) 7 и TLR9 обогащены эндосомным компартментом плазматическоидных дендритных клеток и считаются преобладающими ограничителями этих иммунных комплексов, содержащих нуклеиновые кислоты, иницируя каскад, ведущий к высвобождению IFN типа I. С этой целью несколько ингибиторов TLRs 7 и 9 находятся на стадии клинической разработки для СКВ.

Как уровень IFN α , так и уровень IFN ω повышены при СКВ и могут вызвать подобные иммуномодулирующие действия. Агонизм TLR7 и TLR9 при помощи синтетических лигандов (Gibson et al., Cell Immunol 218:74-86, 2002) или иммунных комплексов из пациентов с СКВ (как описано в настоящем документе) индуцировал как IFN α , так и белок IFN ω транскриптов IFN ω (Han et al., Genes Immun 4:177-

186, 2003) и белка (данные не показаны) повышаются у пациентов с СКВ.

Аутоантитела против IFN типа I также обнаружены у пациентов с СКВ, возможно, в результате повышенного уровня IFN у этих пациентов в сочетании с избыточным гуморальным иммунным ответом. Аутоантител против IFN ω , как было установлено, более распространены, чем антитела против IFN α в когортах обследованных пациентов с СКВ в то время как были выявлены только следовые количества аутоантител против IFN β (Slavikova et al., J Interferon Cytokine Res 23:143-147, 2003). Общая активность, обеспечиваемая IFN ω напоминает эффекты IFN α , свидетельствующие, что повышение уровня IFN ω у пациентов с СКВ может способствовать патогенезу заболевания (Adolf et al., J Biol Chem 265:9290-9295, 1990; Adolf, Mult Scler 1 Suppl 1:S44-47, 1995; Kubes et al., J Interferon Res 14:57-59, 1994; Tiefenthaler et al., J Interferon Cytokine Res 17:327-329, 1997). Наличие и роль IFN β в СКВ является менее определенным. Специфическая нейтрализация IFN α при помощи сывороток пациентов с СКВ в качестве стимулов привела к значительному снижению активности IFN типа I, в то время как нейтрализация IFN β обеспечивает незначительное воздействие при помощи исследованных образцов сыворотки пациентов, предполагая минимальное участие IFN β в патогенезе заболевания (Hua et al., Arthritis Rheum 54:1906-1916, 2006).

Текущие подходы к антагонистам IFN типа I в клинической разработке ориентированы на нейтрализацию спектра подтипов IFN α , а не других интерферонов типа I (β , ϵ , κ , ω), на нейтрализацию цепи IFNAR1 рецептора интерферона таким образом блокируя передачу сигнала от всех IFN типов I или при помощи подходов к вакцинации, специфичных для IFN α (Merrill et al., Ann Rheum Dis 70:1905-1913, 2011; Zagury et al., Proc Natl Acad Sci USA 106:5294-5299, 2009). В ходе клинических испытаний антитела к анти-IFN α у пациентов с СКВ показали частичное снижение характерных признаков IFN типа I у пациентов, проявляющих характерные признаки IFN и небольшую эффективность в поисковом анализе (Merrill et al., Ann Rheum Dis 70:1905-1913, 2011). В ходе клинических исследований фазы 2 терапия анти-IFN α в отсутствие иммунодепрессантов было связано с улучшением признаков и симптомов СКВ, показателей вспышки и стероидной нагрузки на 24 неделе в предварительно указанном биомаркере определенной группы с низким показателем Interferon Signature Metric (ISM) у пациентов с волчанкой умеренной и высокой степени активности. Интересно, что у пациентов в предопределенной группе с высоким показателем ISM эффективности не наблюдалось (Kalunian et al., 2012 ACR/ARHP Annual Meeting; Abstract # 2622, 2012).

Предполагается, что моноклональное антитело против IFNAR1 предотвращает сигнализирование IFN, вызываемое всеми интерферонами типа I, включая IFN β . Несмотря на отсутствие данных для поддержки значительной роли IFN β в патогенезе СКВ, IFN β ИФН может играть более важную роль в противовирусной защите. Конкретная делеция гена, кодирующего IFN β несет значительную восприимчивость к хозяину вирусов по сравнению с аналогичными подверженными мышами, имеющими функциональный β (Lazear et al., J Virol 85:7186-94; Deonarain et al., J Virol 74:3403-09, 2000; Deonarain et al., Circulation 110:3540-3543, 2004; Gerlach et al., J Virol 80:3438-3444, 2006; Koerner et al., J Virol 81:2025-2030, 2007).

Один вариант осуществления данного изобретения заключается в способе лечения или профилактики заболевания, связанного с повышенной выработкой IFN α и IFN ω , который включает введение терапевтически эффективных количеств выделенного антитела, которое связывается с и нейтрализует активность человеческого интерферона омега (IFN ω) и по меньшей мере четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти подтипов (IFN α) или антитела, конкурирующего за связывание с человеческим IFN ω и подтипами человеческого IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G или IFN α J1 с выделенным антителом, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 и вариабельный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24; или VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28 нуждающемуся в лечении пациенту в течение периода достаточного для лечения или профилактики заболевания.

Другой вариант осуществления данного изобретения заключается в способе предотвращения взаимодействия IFN ω и подтипов IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G or IFN α J1 с IFNAR нуждающемуся в лечении пациенту, который включает введение доз выделенного антитела, которое связывается с и нейтрализует активность человеческого интерферона омега (IFN ω) и по меньшей мере четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти подтипов (IFN α) или антитела, конкурирующего за связывание с человеческим IFN ω и подтипами человеческого IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 с выделенным антителом, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 и вариабельный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24; или VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28 пациенту в течение времени, достаточного для предотвращения взаимодействия IFN ω и подтипов IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 с IFNAR.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения антитело, которое можно использовать в способах по изобретению, содержит антитело, которое связывается с IFN ω на одном или нескольких

остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 1 и IFN α 4a на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 19.

Антитела по изобретению могут быть протестированы на предмет их эффективности на животных моделях волчанки, которые включают штаммы мышей, склонных к развитию волчанки и мышей, у которых фенотипы, сходный с волчанкой индуцированы или ускорены при помощи различных агентов (Perry, et al., J Biomed Biotechnol, 2011:271694, 2011. Например, мыши NZB/NZW F1 проявляют зависимость от времени заболеть, которому подвержены особи женского пола, имеющее несколько признаков человеческой волчанки, включая гломерулонефрит. Поскольку несколько различных подтипов IFN α вырабатываются у мыши по сравнению с человеком (van Pesch, et al., J Virol, 78:8219-28, 2004), а также отмечается отсутствие экспрессии IFN ω у мыши, можно использовать тестирование *in vitro* на клетках, соответствующих заболеванию при помощи соответствующих препаратов для лечения заболевания для оценки эффективности и потенциала модифицирования течения заболевания антител по изобретению. Такими анализами *in vitro* являются, например, оценка ингибирования выработки IFN, индуцированной иммунным комплексом СКВ в цельной крови или оценка способности антител к снижению характерных признаков IFN, как описано в настоящем документе.

Домены VH и VL антител к IFN α/ω по изобретению можно включить в биспецифические антитела и молекулы, описанные в настоящем документе, в которых биспецифическое антитело специфически связывается и нейтрализует IFN ω и по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять подтипов (IFN α), например, IFN α B2, IFN α F, IFN α G и IFN α J1, а также второй антиген, как BLyS, CD40L, IL-6, CD27, BDCA2 (CLEC4C, лектиновый домен C-типа, семейство 4, член C), или p40 субъединица IL-12 и IL-23. Кроме того, домены VH и VL любого антитела, конкурирующее за связывание с человеческим IFN ω и подтипами человеческого IFN α IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 с выделенным антителом, содержащим вариативный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 и вариативный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24; или VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28 могут быть использованы. Кроме того, домены VH и VL любого антитела, которое связывается с IFN ω на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 1 и IFN α 4a на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 19 может быть использовано.

BLyS, CD40L, IL-6, CD27, BDCA2 (CLEC4C, лектиновый домен C-типа, семейство 4, член C), или p40 субъединица IL-12 и IL-23 связывающих антител можно получать с использованием способов, описанных в настоящем документе, таких как иммунизация мышей, экспрессирующих локусы человеческого иммуноглобулина (Lonberg et al., Nature 368:856-9, 1994; Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51, 1996; Mendez et al., Nature Genetics 15:146-56, 1997, патенты США №№ 5,770,429, 7,041,870 и 5,939,598) или мышей Balb/c соответствующими белками или внеклеточными доменами белков, или с использованием библиотек фаговых дисплеев, как описано в настоящем документе. Кроме того, существующие антитела к BLyS, CD40L, IL-6, CD27, BDCA2 (CLEC4C, лектиновый домен C-типа, семейство 4, член C) или p40 субъединица IL-12 и IL-23 можно использовать для получения биспецифических молекул.

Введение/Фармацевтические композиции

"Терапевтически эффективное количество дозы" антител к IFN α/ω по изобретению, эффективная при лечении состояний, связанных с повышенной выработкой IFN α и IFN ω можно определить при помощи стандартных методов исследования. Например, дозировку антител к IFN α/ω по изобретению, которая будет эффективна в лечении иммуноопосредуемых воспалительных заболеваний, таких как СКВ можно определить путем введения антител к IFN α/ω в соответствующие животные модели, хорошо известные в данной области техники.

Для идентификации оптимальных диапазонов дозы можно дополнительно использовать анализы *in vitro*. Выбор конкретной эффективной дозы (например, с помощью клинических испытаний) может осуществляться специалистами в данной области на основе нескольких факторов. Такими факторами являются: подлежащее лечению или профилактике заболевание, симптомы заболевания, масса тела пациента, иммунологический статус пациента и другие известные специалистам факторы. Точная доза, предназначенная для применения в составе композиции, зависит от способа введения препарата и тяжести болезни, и должна определяться на основании решения лечащего врача и состояния каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать на основе кривой динамики доза-ответ, полученной в испытываемых системах моделей животных *in vitro*. Антитела по изобретению можно протестировать на предмет их эффективности и эффективной дозировки при помощи любой из моделей, описанных в данном документе.

Для введения предназначенных для терапевтического применения антител можно использовать любой подходящий путь введения, который обеспечивает доставку агента пациенту. Фармацевтические композиции данных антител являются особенно подходящими для парентерального введения, например, внутривенного, внутримышечного, внутривенного, подкожного или интраназального

введения.

Антитела настоящего изобретения можно получить в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество агента в качестве активного компонента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин "носитель" относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или носителю, с которыми вводят активное соединение. Фармацевтическая среда может быть жидкой, как, например, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла растительного, животного или синтетического происхождения, например, арахисовое, соевое, минеральное, кунжутное и другие подобные масла. Например, можно использовать 0,4%-й соляной раствор и 0,3%-й раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых примесей. Затем стерилизацию проводят с использованием стандартных хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для соответствующих физиологических условий, такие как агенты, необходимые для контроля и изменения pH, стабилизаторы, загустители, увлажнители и красители и т. п. Концентрация антитела настоящего изобретения в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее чем приблизительно 0,5%, обычно по меньшей мере приблизительно 1% и до 15 или 20 вес.%, и определяется преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучей среды, вязкости и т. п., в соответствии с конкретным выбранным способом введения.

Таким образом, фармацевтическую композицию настоящего изобретения для внутримышечной инъекции можно получить с содержанием 1 мл стерильной воды буфера и от приблизительно 1 нг до приблизительно 100 мг, например, от приблизительно 50 нг до приблизительно 30 мг, или более предпочтительно - от приблизительно от 5 мг до приблизительно 25 мг антитела настоящего изобретения. Сходным образом, предложенная в настоящем изобретении фармацевтическая композиция для внутривенного введения может содержать приблизительно 250 мл стерильного раствора Рингера и приблизительно от 1 до 30 мг, или, предпочтительнее, приблизительно от 5 до 25 мг предложенного в настоящем изобретении антагониста. Способы изготовления композиций для парентерального введения хорошо известны и описаны более подробно, например, в "Remington's Pharmaceutical Science", 15-е изд., Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания.

Антитела, раскрываемые в настоящем изобретении, могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в соответствующем носителе перед использованием. Было показано, что этот способ эффективен для обычно используемых иммуноглобулинов и белковых препаратов, при этом могут быть использованы известные специалистам способы лиофилизации и восстановления.

Другие варианты осуществления настоящего изобретения. Ниже изложены некоторые дополнительно пронумерованные варианты осуществления настоящего изобретения в соответствии с раскрытием, представленным в настоящем описании. Особенности вариантов осуществления изобретения, изложенные выше, также относятся к каждому из этих далее пронумерованных вариантов осуществления.

1) Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с и нейтрализует активность (а) человеческого интерферона омега ($IFN\omega$) и (b) по меньшей мере четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти подтипов человеческого интерферона альфа ($IFN\alpha$).

2) Антитело по п.1, в котором антитело связывается с и нейтрализует активность подтипов человеческого $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$ и $IFN\alpha J1$.

3) Антитело по п.1 или 2, в котором антитело связывается с и нейтрализует активность подтипов человеческого $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha C$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$ и $IFN\alpha J1$.

4) Антитело по пп.1-3, в котором антитело связывается с и нейтрализует активность подтипов человеческого $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha C$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$, $IFN\alpha J1$ и $IFN\alpha A$.

5) Антитело по пп.1-4, в котором антитело связывается с и нейтрализует активность подтипов человеческого $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha C$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$, $IFN\alpha J1$, $IFN\alpha A$ и $IFN\alpha H2$.

6) Антитело по пп.1-5, в котором антитело связывается с и нейтрализует активность подтипов человеческого $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha C$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$, $IFN\alpha J1$, $IFN\alpha A$, $IFN\alpha H2$ и $IFN\alpha K$.

7) Антитело по пп.1-6, в котором антитело связывается с и нейтрализует активность подтипов человеческого $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha C$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$, $IFN\alpha J1$, $IFN\alpha A$, $IFN\alpha H2$, $IFN\alpha K$ и $IFN\alpha WA$.

8) Антитело по пп.1-7, в котором антитело связывается с и нейтрализует активность подтипов человеческого $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha C$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$, $IFN\alpha J1$, $IFN\alpha A$ $IFN\alpha H2$, $IFN\alpha K$, $IFN\alpha WA$ и $IFN\alpha 4a$.

9) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-8, в котором активность человеческого $IFN\omega$ и подтипов человеческого $IFN\alpha$ представляет собой ингибирование экспрессии секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого интерфероном промотора ISG54 в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции 2 (STAT2), регуляторный фактор интерферона 9 (IRF9) и SEAP.

10) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-8, в котором антитело ингибирует активность $IFN\omega$ человека со значением IC_{50} около 5×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, или около 1×10^{-12} М или менее, а также ингибирует активность подтипов $IFN\alpha$ $IFN\alpha B2$, $IFN\alpha F$, $IFN\alpha G$ или $IFN\alpha J1$ со значением IC_{50} око-

ло 5×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, или около 1×10^{-12} М или менее при условиях, определенных в примере 3 в разделе "Измерение аффинности".

11) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-10, в котором антитело связывает IFN ω человека с константой диссоциации (K_D) около 5×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 5×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 5×10^{-11} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, около 5×10^{-12} М или менее, или около 1×10^{-12} М или менее, а также связывают подтипы IFN α человека IFN α B2, IFN α F, IFN α G или IFN α J1 со значением K_D около 5×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 5×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 5×10^{-11} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, около 5×10^{-12} М или менее, или около 5×10^{-12} М или менее, в котором K_D измеряют с использованием условий, определенных в примере 3 в разделе "Измерение аффинности".

12) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-11, в котором антитело конкурирует за связывание с IFN ω человека и подтипами IFN α человека IFN α B2, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 с выделенным антителом, содержащим:

а) вариабельный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 и вариабельный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24; или

б) VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28.

13) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-12, в котором антитело связывается с IFN ω на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 1.

14) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-13, в котором антитело связывается с IFN ω на остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 1.

15) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-14, в котором антитело дополнительно связывается по меньшей мере с одним остатком IFN ω , выбранным из группы, состоящей из остатков P26, K31 и R34 с SEQ ID NO: 1.

16) Антитело по п.14 или 15, в котором антитело дополнительно связывается по меньшей мере с одним остатком IFN ω , выбранным из группы, состоящей из остатков R22, R23, I24, S25, P26, K31, D32, R34, D35, Q40, K134, M146, E147, M149, K150, F153 и L154 с SEQ ID NO: 1.

17) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-16, в котором антитело связывается с IFN α 4a на одном или нескольких остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 19.

18) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-17, в котором антитело связывается с IFN α 4a на остатках F27, L30 и R33 последовательности SEQ ID NO: 19.

19) Антитело по п.17 или 18, в котором антитело дополнительно связывается по меньшей мере с одним остатком IFN α 4a, выбранным из группы, состоящей из остатков H26, K31 и R34 с SEQ ID NO: 19.

20) Антитело по любому из вариантов осуществления 17-19, в котором антитело дополнительно связывается по меньшей мере с одним остатком IFN α 4a, выбранным из группы, состоящей из остатков A19, G22, R23, I24, S25, H26, C29, K31, D32, H34, D35, V143, A146, E147, M149, R150 и S153 с SEQ ID NO: 19.

21) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-20, антитело ингибирует активность индуцированного вирусом лейкоцитарного интерферона.

22) Антитело по п.21, в котором активность индуцированного вирусом лейкоцитарного интерферона представляет собой высвобождение IP-10 в цельной крови, индуцированное 100 Ед/мл интерферона.

23) Антитело по п.22, в котором активность ингибируется на более, чем 50% в присутствии 50 мкг/мл антитела.

24) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-23, в котором антитело ингибирует активность IFN, индуцированного иммунным комплексом системной красной волчанки (СКВ).

25) Антитело по п.24, в котором активность ингибируется на более, чем 50%.

26) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-25, содержащее:

а) вариабельный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 и вариабельный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24; или

б) вариабельный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 и вариабельный участок легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 28.

27) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-26, в котором антитело не связывает и не нейтрализует интерферон- β (IFN β).

28) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-27, в котором антитело не связывает и не нейтрализует IFN α D человека.

29) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-28, которое представляет собой антитело человека или гуманизированное антитело 30) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-29, в

котором антитела могут относиться к типу IgG1, IgG2, IgG3 или изотипу IgG4.

31) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-30, в котором антитело является биспецифическим.

32) Антитело по п.31, в котором антитело связывается с BLYS, CD40L, IL-6, CD27, BDCA2 или p40 субъединицей IL-12 или IL-23.

33) Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из вариантов осуществления 1-32 и фармацевтически приемлемый носитель.

34) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-32 или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 33 для применения в лечении или профилактике заболевания, связанного с повышенной выработкой IFN α и/или IFN ω .

35) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-32 или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 33 для применения в соответствии с вариантом осуществления 34, в котором заболевание, связанное с повышенной выработкой IFN α и/или IFN ω представляет собой иммуноопосредованное воспалительное заболевание, дополнительно, в котором иммуноопосредованное воспалительное заболевание является системной красной волчанкой (СКВ), диабетом 1-го типа, псориазом, первичным синдромом Шегрена, системным склерозом или ревматоидным артритом.

36) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-32 или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 33 для применения в соответствии с вариантом осуществления 34 или 35, в котором, у пациента проявляются характерные признаки интерферона типа I.

37) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-32 или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 33 для применения в соответствии с вариантом осуществления 34-36, в котором, антитело представляет собой биспецифическое антитело, дополнительно, в котором биспецифическое антитело связывает BLYS, CD40L, IL-6, CD27, BDCA2 или p40 субъединицу IL-12 или IL-23.

38) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-32 или 37, или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 33 для применения при ингибировании взаимодействия IFN ω и подтипов IFN α IFN α B2, IFN α C, IFN α F, IFN α G и/или IFN α J1 с IFNAR у пациента.

39) Антитело или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 38, в котором пациент имеет иммуноопосредованное воспалительное заболевание, необязательно, в котором иммуноопосредованное воспалительное заболевание иммунной является СКВ, диабетом 1-го типа, псориазом, первичным синдромом Шегрена, системным склерозом или ревматоидным артритом.

40) Антитело или фармацевтическая композиция для применения согласно варианту осуществления 38 или 39, в котором, у пациента проявляются характерные признаки интерферона типа I.

41) Антитело или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из вариантами осуществления 38-40, в котором антитело является биспецифическим антителом, необязательно, в котором биспецифическое антитело связывает BLYS, CD40L, IL-6, CD27, BDCA2, p40 субъединицу IL-12 или IL-23, или BDCA2.

Настоящее изобретение сейчас будет охарактеризовано с помощью нижеприведенных примеров, описывающих настоящее изобретение, но не ограничивающих его.

Пример 1. Получение антигенов IFN типа I, которые используют для иммунизации, разделения фрактов, характеризации антител и кристаллографических исследований.

Двенадцать отдельных рекомбинантных человеческих интерферонов альфа типа I, включая Альфа A (alpha 2a) (SEQ ID NO: 5), Альфа B2 (alpha 8) (SEQ ID NO: 6), Альфа C (alpha 10) (SEQ ID NO: 7), Альфа D (alpha 1) (SEQ ID NO: 8), Альфа F (alpha 21) (SEQ ID NO: 9), Альфа G (alpha 5) (SEQ ID NO: 10), Альфа H2 (alpha 14) (SEQ ID NO: 11), Альфа I (alpha 17) (SEQ ID NO: 12), Альфа J1 (alpha 7) (SEQ ID NO: 13), Альфа K (alpha 6) (SEQ ID NO: 14), Альфа 4b (alpha 4) (SEQ ID NO: 15), Альфа WA (alpha 16) (SEQ ID NO: 16) и IFN омега шимпанзе (IFN ω шимпанзе) (SEQ ID NO: 3) экспрессировали в HEK 293 клетках при помощи стандартных способов с использованием сигнальных последовательностей, таких, как SEQ ID NOs: 17-21. Для улучшения уровня экспрессии и растворимости, мутант одной аминокислоты в положении 80 человеческого IFN-омега (T80E) получали и экспрессировали в HEK 293 клетках. Вариант T80E IFN ω (SEQ ID NO: 2) имеет активность, сравнимую с белком дикого типа.

Пример 2. Получение антител, связывающих и нейтрализующих IFN α и IFN ω . Иммунизация мыши. Получение C2595.

Мышам BALB/c проводили иммунизацию внутривенно несколько раз смесью IFN-альфа человека, IFN-омега шимпанзе и IFN-омега яванского макака. В день 0 мышей иммунизировали IFN-омега шимпанзе. В день 14 тех же мышей иммунизировали смесью IFN-омега человека и шимпанзе, IFN α D человека, IFN α J1, IFN α C, IFN α B2, IFN α H2, IFN α A, IFN α 4a, IFN α G, IFN α F, IFN α WA и IFN α I. В день 208, тех же мышей иммунизировали смесью IFN-омега яванского макака, IFN α 4b человека, IFN α A, IFN α D и IFN α K. В день 221, тех же мышей иммунизировали смесью IFN-омега яванского макака, IFN α J человека, IFN α I, IFN α 4a, IFN α A и IFN α F.

Конкретные титры IgG оценивали после иммунизации. После получения достаточных титров выделяли спленоциты и сливали их с клетками FO. Полученные гибридомы высевали на 96-луночные планшеты и культивировали в течение 10 суток. Антиген-специфические клоны впервые определили методом первичного скрининга связывания IFN-омега шимпанзе и связывания смеси IFN α A человека, IFN α H2, IFN α D, а также IFN α 4а методом ИФА. Дополнительно проводили скрининг гибридом, связывающихся с IFN-альфа и/или IFN-омега при помощи мультиплексного анализа Luminex. Клоны, связывающиеся в широком смысле с большинством IFN-альфа и IFN-омега человека и яванского макака отбирали для дальнейших исследований.

Библиотеки фагового дисплея.

IFN типа I человека, связывающийся с Fabs, отбирали из новых полученных дисплейных pIX-фаговых библиотек, описанных в публикации Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-396, 2010; международная патентная публикация № WO2009/085462; публикация патента США № US2010/0021477; публикация патента США № US2012/0108795.

Выбор IFWM43.

Дисплейные pIX-фаговые библиотеки разделяли методом пэннинга относительно очищенного IFN-альфа A типа I (IFN α 2), полученного из экспрессии последовательности человеческого IFN-альфа A дикого типа, содержащего меченый полигистидином C-конец и очищали при помощи иммобилизованной металл-аффинной хроматографии. Использовали три круга пэннинга. 100 nM, 10 nM и 1 nM биотинилированного антигена использовали соответственно для первого, второго и третьего круга пэннинга. Сначала проводили скрининг моноклональных Fabs, полученных из фагмидных клонов, собранных после трех кругов пэннинга на предмет их связывания IFN-омега шимпанзе, IFN α 2 человека, IFN α 1, IFN α H2, IFN α G, IFN α F и авидином методом стандартного ИФА. Фрагменты Fab (FABS), которые специально связывали с IFN-альфа и IFN-омега при проведении ИФА секвенировали и идентифицировали в качестве уникальных связующих IFN, если они имеют разные последовательности V-участка. Fab-фрагменты преобразовывали в человеческие монАТ IgG1 и идентифицировали как связующие IFN после дополнительной проверки их нейтрализующей активности в диапазоне клеточных анализов, относящихся к идентификации противовоспалительной активности.

Идентификация IFWM88.

Дисплейные pIX-фаговые библиотеки разделяли методом пэннинга относительно очищенного IFN-альфа G типа I (α 5), полученного из экспрессии последовательности человеческого IFN-альфа A дикого типа, содержащего меченый полигистидином C-конец и очищали при помощи иммобилизованной металл-аффинной хроматографии. Использовали три круга пэннинга. 100 nM, 10 nM и 1 nM биотинилированного антигена использовали соответственно для первого, второго и третьего круга пэннинга. Сначала проводили скрининг моноклональных Fabs, полученных из фагмидных клонов, собранных после трех кругов пэннинга на предмет их связывания IFN-омега шимпанзе, IFN α 2 человека, IFN α 1, IFN α H2, IFN α G, IFN α F и авидином методом стандартного ИФА. Фрагменты Fab (FABS), которые специально связывали с IFN-альфа и IFN-омега при проведении ИФА секвенировали и идентифицировали в качестве уникальных связующих IFN, если они имеют разные последовательности V-участка. Fab-фрагменты преобразовывали в человеческие монАТ IgG1 и идентифицировали как связующие IFN после дополнительной проверки их нейтрализующей активности в диапазоне клеточных анализов, относящихся к идентификации противовоспалительной активности.

Аминокислотные последовательности варьируемых участков, полученных антител представлены следующим образом: IFWM43 VH: SEQ ID NO: 23; IFWM43 VL: SEQ ID NO: 24; и IFWM88 VH: SEQ ID NO: 25; IFWM88 VL: SEQ ID NO: 26; C2595 VH: SEQ ID NO: 27, C2494 VL: SEQ ID NO: 28. Варируемые участки C2595 переносили на константный участок IgG1 человека и полученное антитело было названо M3239. IFWM43 также называется M43, а IFWM88 также называется M88.

Пример 3. Характеризация антител, связывающих и нейтрализующих IFN α и IFN ω .

Методы. Измерения аффинности.

Аффинности связывания антител проводили с использованием технологии SPR с Proteon (Bio-Rad, г. Геркулес, штат Калифорния). Козы антитела к анти-человеческому Fc (производство) были присоединены аминами к чипу GLC (Bio-Rad, г. Геркулес, штат Калифорния) с использованием стандартного химического метода NHS/EDC, как рекомендуется при производстве. Анти-IFN моноклональные антитела затем загружали на чип, связанный антителами в течение 2 мин при скорости потока 30 мкл/мин. После промывки рабочим буфером (композицией буфера) в течение 2 мин при скорости потока 50 мкл/мл, рекомбинантные антигены IFN в 5 различных концентрациях в диапазоне от 100 nM до 1,23 nM с разбавлением 1:3 связывали в течение 3 мин и разделяли в течение 10 мин при скорости потока 50 мкл/мл. Чипы получали при помощи 100 mM фосфорной кислоты в каждом направлении между прогонкой различных антигенов. Анализ данных проводили с использованием программы ProteOn manager (Bio-Rad, г. Геркулес, штат Калифорния). Сенсограммы группировали по моноклональным антителам. После применения выравнивания и эталонной коррекции (с использованием привязывания промежуточного пятна либо пустого канала), данные SPR глобально подгоняли под модель Ленгмюра для константы скорости

кинетики ($K_D = k_{off}/k_{on}$, где K_D = равновесная константа диссоциации, k_{on} = константа скорости ассоциации, а k_{off} = константа скорости диссоциации).

Анализ "гена-репортера ISRE".

Использовали клетки HEK-Blue™ IFN- α/β (InvivoGen, г. Сан-Диего, штат Калифорния), полученные для экспрессии сигнального пути полностью активного IFN типа I (стабильно экспрессирующего STAT2 и IRF9), а также трансфицированные геном-репортером SEAP под контролем индуцируемого IFN α/β промотора ISG54. Клетки выращивали в колбах T150 с покрытием коллагена типа I в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 мкг/мл бластицидина и 30 мкг/мл зеоцина при 37°C, 5%CO₂. Клетки собирали и высевали в 384-луночные планшеты при 50 мкл на лунку при 50000 клеток на мл. Высеванные клетки инкубировали при температуре 37°C, 5% CO₂ в течение 24 ч. Протестированные образцы интерферона подготавливали и разводили в отработанной среде без HEK ISRE сыворотки и 50 мкл образца IFN был добавляли в каждую лунку. Высеванные клетки инкубировали при температуре 37°C, 5% CO₂ в течение 20 ч. Щелочную фосфатазу обнаруживали из 20 мкл супернатантов высеванных клеток, 60 мкл/лунку QUANTI-Blue™ ресуспендировали в фильтрованной воде после инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре. Оптическая плотность была считана на спектрофотометре для прочтения планшетов Biotek Synergy при 650 нм.

Некоторые анализы гена-репортера ISRE проводили в 96-луночных планшетах следующим образом: Клетки HEK-Blue™ IFN- α/β (InvivoGen, г. Сан-Диего, штат Калифорния) высевали с плотностью 50000 клеток на лунку в 100 мкл выбранной свободной среды (DMEM+Glutamax/с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, Gibco), и инкубировали в течение ночи при температуре 37°C. На следующий день подготавливали стимулы IFN типа I (т.е. рекомбинантный интерферон, лейкоцитарный IFN, IC-индуцированные препараты IFN, сыворотки и т.д.) с или без ингибиторов IFN типа I в отдельной 96-луночной U-нижней передаточной пластине (BD Falcon) и предварительно нагревали при температуре 37°C в течение 10 мин. Пластины клеток удаляли из инкубатора и среду удаляли и заменяли 100 мкл соответствующих препаратов, полученных в 96-луночной U-нижней передаточной пластине. Клетки помещали обратно при температуре 37°C и оставляли в течение 24 ч. На следующий день 40 мкл супернатанта переносили в 96-луночную плоскодонную пластину (BD Falcon), содержащую 160 мкл субстрата SEAP QUANTI-Blue™ (Invivogen). Планшет оставляли для проявления в течение примерно 15 мин и в это время с него считывали данные с помощью спектрометра при 650 нм поглотительной способности.

Анализ высвобождения IP-10.

Гепаринизированную цельную кровь, взятую у здоровых добровольцев помещали в 96-луночный U-нижний планшет, содержащий несколько различных ингибиторов IFN типа I вместе с контрольными изотипами. Ингибиторы и соответствующий контроль изотипа разводили в среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Интерфероны и ингибиторы или контрольные изотипы разводили в объеме 30 мкл среды RPMI, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки. После предварительной инкубации образцов в течение 15-20 мин добавляли 240 мкл гепаринизированной цельной крови в планшеты, содержащие разведения до достижения конечного объема 270 мкл. Образцы смешивали и инкубировали при температуре 37°C в течение 20-22 ч. После инкубации образцы центрифугировали при 400 оборотах в течение 5 мин, затем плазму собирали и замораживали для дальнейшего анализа. Профилирование IP-10 проводилось с применением набора цитокинов/хемокинов Milliplex (Millipore, Premixed 39 plex). Подготовку образца и анализ проводили в соответствии с рекомендациями производителя при помощи системы модели BioRad (Bioplex™ 200) и программного обеспечения Bioplex manager™ версии 4.1 для получения данных. Статистический анализ при помощи программного обеспечения Graph pad Prism V.5. В некоторых случаях проводили количественное определение IP-10 с помощью одного анализа из набора для ИФА компании Qiagen.

Анализ характерных генных признаков цельной крови при СКВ.

Цельную кровь от доноров с СКВ получали коммерческим путем через компанию Asterand. Анализ экспрессии генов цельной крови проводили с использованием пользовательской карты массива TaqMap low density, содержащей праймеры и зонды, обогащенные IFN-стимулированными генами (ISG). Гены, включенные в массиве были следующими: ACTB, IL6, IL10, IL13, FAS, IL15, IL21, IL17A, EIF2AK2, OASL, 18S, STAT1, LY6E, PLSCR1, MX1, IFIT1, IFI44, IFI44L, IFI27, ISG15, RSAD2, CXCL10, LAG3 и TNFSF10. Усиление ОТ-ПЦР проводили на системе обнаружения последовательности ABI Prism 7900 HT Sequence Detection system (Applied Biosystems, штат Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. Относительные значения экспрессии рассчитывали при помощи метода сравнительного порогового цикла (C_t). Вкратце, в этом методе используется формула $2^{-\Delta\Delta C_t}$ для расчета экспрессии генов-мишеней, нормированных для калибровочной группы (нормальной необработанной здоровой цельной крови). Бета-актин (ACTB) был выбран в качестве эндогенного контроля. Пороговый цикл (C_t) указывает номер цикла, с помощью которого количество амплифицированной мишени достигает фиксированного порога. Данные C_t для всех интерферон-индуцированных генов-мишеней и ACTB были использованы для создания значений ΔC_t [$\Delta C_t = C_t$ (ген-мишень) - C_t (ACTB)]. Значения $\Delta\Delta C_t$ рассчитывали

путем вычитания среднего значения контрольной группы (5 нормальных образцов необработанной цельной крови, полученные от здоровых доноров) от значения ΔC_t каждой мишени. Значения относительной экспрессии рассчитывали при помощи уравнения $2^{-\Delta\Delta C_t}$. У 3 доноров с СКВ в этом эксперименте генная экспрессия была как минимум в 2 раза выше по сравнению с контрольной группой для 9 ISG на массив низкой плотности. Для сравнения эффектов ингибиторов IFN типа I среди всех 3 доноров, % ингибирования сначала определяли по следующей формуле для каждого лечения/ингибитора:

$(2^{-\Delta\Delta C_t} \text{ необработанная кровь с СКВ} - 2^{-\Delta\Delta C_t} \text{ ингибитор}/2\text{-необработанная кровь с СКВ}) \times 100 = \% \text{ ингибирования}$. Далее базовый % для каждой обработки по всем трем донорам рассчитывали при помощи следующего уравнения: $100\% \text{ ингибирования} = \text{базовый \%}$.

Затем определяли средний базовый % всех 3 доноров, сгруппированных по группам лечения для каждого из 9 генов. Показатель контрольной группы пациентов с СКВ, которые не получали лечения, ("только СКВ в крови") был установлен на 100, чтобы обозначить, что эта группа соответствует 100% от базового значения. Базовый обозначает, что имеется 0% IFN-индуцированной экспрессии гена. Наконец, среднее и стандартное отклонение в каждой группе лечения по всем 9 генам были определены и отражены на графике. Статистическую значимость определяли путем проведения Т-теста Стьюдента.

Подготовка иммунного комплекса СКВ.

Плазма пациентов с СКВ была получена от компании SCIPAC (Кент, Великобритания). Образцы плазмы, имеющие активность IFN типа I, как определено посредством анализа гена-репортера ISRE, дополнительно использовали для очистки IgG. IgG очищали при помощи спин-колонки NAB™ Protein A/G согласно рекомендации производителя (Thermo Scientific), а анализ белка проводили для определения концентрации (Pierce BCA). Лизаты аутоантигенов клеток готовили при помощи клеток HEK293T, суспендированных в концентрации 5×10^7 клеток/мл в 1х фосфатно-солевом буфере (PBS). Для разрушения клеток HEK293T проводили 4 цикла замораживания-оттаивания в течение по меньшей мере 10 мин при температуре замораживания -80°C и температуре оттаивания 37°C , кроме первичного замораживания в течение по меньшей мере 30 минут; после замораживания-оттаивания, продукты распада клеток удаляли центрифугированием (400 оборотов в течение 5 мин) и количество растворимого антигена определяли посредством белкового количественного анализа. В соотношении 1: 1, очищенный IgG и лизат некротических клеток инкубировали вместе в течение 30 мин при комнатной температуре с образованием иммунных комплексов. Конечную концентрацию 400 мкг/мл иммунного комплекса затем добавляли в 3 лунки 6-луночного планшета в общем объеме 4 мл среды RBMC на лунку. IgG здорового донора очищали и "заключали в комплексы" таким же образом, как только что было описано и использовали для стимулирования RBMC в качестве контроля. Кондиционированные среды из этих исследований разделяли на аликвоты и использовали в качестве источника эндогенного интерферона для экспериментов по ингибированию. Активности IFN не наблюдалось с применением препаратов, полученных из IgG, выделенного у здоровых добровольцев.

Результаты

Аффинность к и нейтрализация рекомбинантных ИФН типа I.

В табл. 2 представлены константы диссоциации (K_D) антител M43, M88 и M3239 к отдельным рекомбинантным человеческим интерферонам (IFN) типа I. M43, M88 и C2595 нейтрализовали по меньшей мере четыре молекулы IFN α : alphaB2, alphaF, alphaG и alphaJ1. Связывание для alphaD не наблюдалось. В табл. 3 приведены значения IC_{50} для антител M43, M88 и M3239 (C2595) к отдельным рекомбинантным человеческим интерферонам типа I, измеренные в ходе анализа репортерного гена. M43 показал широко нейтрализующую способность, ингибируя по меньшей мере 10 молекул IFN α . M3239 нейтрализовал IFN ω со значением $pM IC_{50}$ в то время как M43 нейтрализовал IFN ω со значением IC_{50} в диапазоне нМ. M88 не показал нейтрализующую активность по отношению к IFN ω в конкретном тесте из-за очень слабого связывания с ним. Тем не менее, после созревания аффинности, антитела, полученные из M88 показали сильную нейтрализующую активность IFN ω при сохранении своей широкой нейтрализующей активности мероприятий IFN α (данные не показаны). Ни одно из антител не связывалось с и не нейтрализовало IFN β .

Таблица 2

Антиген	K _D (нМ) антитела		
	M43	M88	M3239
IFN α A	0,1	14,9	OC
IFN α B2	0,9	0,3	32,2
IFN α C	0,4	3,2	1,3
IFN α D	OC	OC	OC
IFN α F	0,9	1	15,1
IFN α G	0,6	0,8	10,3
IFN α H2	0,6	5,5	61,6
IFN α J1	0,4	4,5	4,3
IFN α K	0,3	H/o	OC
IFN α I	H/o	H/o	H/o
IFN α WA	0,6	97,3	OC
IFN α 4a	1,7	23,3	OC
IFN β	8	OC	OC
IFN ω	0,3	53	4,5
OC= отсутствие связывания			
H/I: не испытывали			
M3239: человеческий/мышинный химерный IgG1, полученный из c2595			

Таблица 3

Антиген	IC ₅₀ (нМ) антитела		
	M43	M88	C2595
IFN α A	0,1	H/Д	H/Д
IFN α B2	25,9	25,2	11,1
IFN α C	14,9	136,1	1,5
IFN α D	H/Д	H/Д	H/Д
IFN α F	3,7	24,6	2,6
IFN α G	5,3	23,4	2,6
IFN α H2	51	PA	20,3
IFN α J1	1	21,9	1,4
IFN α K	10,4	H/Д	H/Д
IFN α I	H/o	H/o	H/o
IFN α WA	9,2	H/Д	H/Д
IFN α 4a	8,1	218,6	H/Д
IFN β	H/Д	H/Д	H/Д
IFN ω	18,5	H/Д	0,9
NA: отсутствие нейтрализующей активности			
PA: частичная нейтрализующая активность			
H/I: не испытывали			

Нейтрализация эндогенного IFN типа I

Способность антител нейтрализовать эндогенный IFN типа I оценивали в анализе, оценивающем высвобождение хемокина IP-10 (CXCL10) из цельной крови человека, стимулированного эндогенным лейкоцитарным IFN (вирусного генеза) или рекомбинантным IFN ω . Дозозависимое ингибирование как лейкоцитарного IFN (фиг. 1A), так и рекомбинантного IFN ω (фиг. 1B) отмечалось с M43 и C2595, что указывает на способность антител нейтрализовать активность широкого спектра типа I, например, вырабатываемого лейкоцитами, индуцированными вирусной инфекцией. Эндогенный лейкоцитарный IFN был приобретен у компании Sigma (номер по каталогу I4784-1MU).

Нейтрализация болезней, связанных со средой IFN Антитела тестировали на их способность снижать уровень IFN, индуцированного иммунным комплексом СКВ в качестве стимула лучшего представления среды IFN типа I, присутствующей в СКВ. IFN, индуцированный иммунным комплексом СКВ получали путем стимуляции человеческих МКПК при помощи иммунных комплексов, полученных от пациентов с СКВ и эту кондиционированную среду использовали в анализе репортерного гена, индуцируемого IFN типа I анализы (гена-репортера ISRE, как описано выше) в присутствии ингибитора монокло-

нальных антител и контрольных моноклональных антител. Добавление селективного моноклонального антитела, нейтрализующего IFN ω в комбинации с 3 различными моноклональными антителами антагониста IFN α дополнительно снизило общую активность IFN, индуцируемого иммунными комплексами по сравнению с анти-IFN α моноклональными антителами в присутствии эквивалентного количества моноклонального антитела контрольного изотипа (фиг. 2). Кроме того, моноклональное антитело M43 к анти-IFN α/ω показало дальнейшее подавление активности по сравнению с моноклональными антителами ингибитора IFN α , предполагая, что двойная блокада IFN α и IFN ω может больше снизить общую активность IFN, чем только нейтрализация IFN α (фиг. 2).

IFN ω способствует образованию среды IFN, связанной с СКВ. Был разработан анализ характерных генных признаков СКВ, как описано выше, при помощи комбинации из девяти IFN-индуцированных генов. Была протестирована способность различных антител ингибировать характерные генные признаки.

Моноклональное антитело (anti- ω) IFN ω -специфического антагониста снизило модуляцию характерных признаков интерферона по сравнению с эквивалентной концентрацией контрольного мАт изотипа, предполагая, что IFN- ω является частью активной среды IFN типа I, которая индуцирует характерные признаки IFN при СКВ. Сочетание антитела к IFN ω с антителом к IFN α привело к более выраженному подавлению признаков IFN, характерных для крови этих больных, чем ингибитор IFN α или IFN ω сам по себе (фиг. 3).

Пример 4. Конкурентное картирование эпитопов Эксперименты связывания эпитопа проводили с использованием метода немеченного конкурентно-связывающего анализа в режиме реального времени при помощи набора Octet (ForteBio, Менло-Парк, Калифорния). Использовали два формата анализа: формат анализа в тандеме и классический формат сэндвич-анализа.

В ходе анализа в формате тандем стрептавидиновые кончики бидатчика (forteBio, Менло-Парк, штат Калифорния) погружали в дозе 0,5 мкг/мл биотинилированного рекомбинантного интерферона в течение 5 минут, в то время как проводили измерение кинетического сигнала в режиме реального времени. Затем кончики погружали в первый набор моноклональных антител (10 мкг/мл) в течение 15 мин. Затем кончики последовательно погружали во второй набор моноклональных антител (10 мкг/мл) в течение еще 10 или 15 мин. Положительное связывание сигнала от кончиков, погруженных во второй набор моноклональных антител показывает их связывание с различными эпитопами из первого набора моноклональных антител, а отрицательный сигнал показывает их связывание с одинаковыми эпитопами. Для устранения ложных результатов из-за разницы аффинности двух наборов моноклональных антител, эксперимент повторяли в обратном порядке, то есть кончики погружали во второй набор моноклональных антител, а затем в первый набор моноклональных антител. Все антитела и антигены разбавляли в фосфатно-солевом буфере с добавлением 1 мг/мл BSA и 0,02% Tween 20.

В классическом формате сэндвич-анализа первый набор моноклональных соединяли с аминореактивными кончиками биодатчиков с использованием стандартного NHS/EDC-опосредованного химического метода с соблюдением протокола производства (в forteBio, Менло-Парк, Калифорния). После гашения в течение 5 мин в этанолаmine, кончики погружали в рекомбинантные интерфероны (2 мкг/мл) в течение 10 мин, прежде чем они были погружены во 2 набор моноклональных антител (15 мкг/мл) в течение 10 или 15 мин. Соединительные моноклональные антитела разводили в буфере MES 6.0 в то время как отсортированные моноклональные антитела и антигены разводили в фосфатно-солевом буфере с концентрацией 1 мг/мл BSA и 0,02% Tween 20.

Проводили три эксперимента связывания эпитопа с использованием обоих форматов анализов с использованием следующих антител: M43, M88 и C2595 (связывание множества подтипов IFN α и IFN ω), C2601 и M42 (связывает IFN ω , однако слабо связывается с подтипами IFN α), а также C2605 (связывание множества подтипов IFN α , но не IFN ω). Различные молекулы IFN- α тестировали в ходе конкурентного анализа (подтипы IFN α IFN α A человека, IFN α B, IFN α C, IFN α F, IFN α G, IFN α H, IFN α J, IFN α 2, IFN α 4a, а также IFN ω шимпанзе и молекулы IFNAR2-Fc человека).

В табл. 4 представлены результаты конкуренции в присутствии M43, а в табл. 5 представлена конкуренция в присутствии IFNAR2-Rc. M43 и M88 конкурировали друг с другом за связывание со всеми протестированными молекулами IFN α и IFN ω шимпанзе. M42, который не связывается с IFN ω , не конкурировал за связывание с молекулами IFN с M43. M43 конкурировал с C2595 и IFNAR-Fc за связывание с IFN ω шимпанзе и различными молекулами IFN α . C2605 не конкурировал с M43 за связывание с большинством IFN α , что указывает на то, что два антитела связывают различный эпитоп. C2601, сильное связывающее вещество в отношении IFN ω , однако слабое связывающее вещество в отношении IFN α , не конкурировало с M43 за связывание с IFN ω с M43, что указывает на то, что два антитела связывают различный эпитоп. C2595, но не C2601 или C2605 конкурировало за связывание с IFN ω шимпанзе и/или IFN α A с IFNAR2-Fc. Антитела, связывающие IFN ω и множество подтипов IFN α и, таким образом, определяет различные эпитопные участки, как указано ниже: BinA: моноклональные антитела M43, M88, C2595. Антитела, связывающие только IFN α или IFN ω образуют различные эпитопные участки.

Таблица 4

Антиген	Антитело или слитый белок рецептора						
	M80	M88	M42	C2595	c2601*	c2605**	IFN α 2-Fc
IFN α A	-	н/и	+	-	+	++	-
IFN α B	н/и	-	н/и	-	-	-	-
IFN α C	н/и	-	н/и	-	-	++	-
IFN α F	н/и	-	н/и	-	+	++	-
IFN α G	н/и	-	+	-	-	++	-
IFN α H	-	-	+	-	-	++	-
IFN α J	н/и	-	н/и	-	-	++	-
IFN α 2	-	н/и	н/и	-	+	++	-
IFN α 4a	н/и	-	н/и	-	-	++	-
IFN ω шимпанзе	-	-	н/и	-	++	-	-
«-» указывает на отсутствие связывания							
«+» или «++» указывает на связывание							
н/и: не испытывали							
*c2601 не связывается с IFN α A с высокой аффинностью							
**c2605 не связывается с IFN ω шимпанзе							

Таблица 5

Антитело	Антиген	
	IFN ω шимпанзе	IFN α A
C2595	-	-
C2601	++	- *
C2605	- * *	++

*c2601 не связывается с IFN α A с высокой аффинностью;

**c2605 не связывается с IFN ω шимпанзе.

Пример 5. Эпитоп M43, полученный из кристаллической структуры антитела M43 к анти-IFN α/ω ; в комплексе мутантом с T80E IFN ω IFWM43 (далее M43 и FabM43 для мАТ и Fab, соответственно) широко нейтрализует молекулы IFN α человека и IFN ω и показывает связывание с несколькими подтипами IFN α и IFN ω человека. Для выявления структурной основы для своей специфичности к подтипам IFN α и IFN ω была определена кристаллическая структура IFN- ω в комплексе с FabM43.

Материалы и способы

Белки.

FabM43, помеченный His-метками (IgG1/к изотип) и IFN ω человека с мутацией T80E (в данном примере IFN ω и IFN ω T80E являются синонимами) экспрессировали в клетках HEK293F и очищали методом аффинной и гель-фильтрационной хроматографии. Белки были в 20 mM Tris pH 7,4, 50 mM NaCl.

Кристаллизация комплекса IFN ω /FabM43.

Комплекс получали путем смешивания IFN ω с FabM43 в молярном соотношении 1,05: 1,0 (избыток IFN ω), очищали на колонке Superdex 200, уравновешенную 20 mM ацетата натрия, pH 5,5, 0,1 M NaCl и 10% глицерина. Очищенный комплекс концентрировали до 10,24 мг/мл с помощью отсечки Amicon Ultra 10-кДа. Кристаллы, пригодные для X-дифракции получали в виде сидячей капли от 0,1 M MES, pH 6,5, 26% ПЭГ 3350, 1 M LiCl, 0,7% 1-бутанола с МПК высеиванием, как описано в публикации (Obmolova et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66:927-33, 2010).

Регистрация данных рентгеновской кристаллографии и определение структуры.

Для регистрации данных рентгеновской кристаллографии кристаллы погружали на несколько секунд в синтетический маточный раствор (0,1 M MES, pH 6,5, 20% ПЭГ 3350, 1 M LiCl), добавляли 20% глицерина и замораживали в жидком азоте. Данные рентгеновской дифракции регистрировали на синхротроне Swiss Light Source. Рентгеновские данные обрабатывали с помощью программы XDS (Kabsch, Acta Crystallographica 66: 125-132, 2010). Статистика данных рентгенографического анализа представлена в табл. 6.

Структуру восстанавливали методом молекулярного замещения с помощью Phaser (Read, Acta Cryst-

tallorg D Biol Crystallogr, 57:1373-82, 2001). Моделями поиска для МЗ были кристаллическая структура Fab15 (PDB ID 3NCJ; Luo et al., J Mol Biol 402:708-719, 2010) и IFN- α 2 (PDB ID 1RH2; Radhakrishnan et al., Structure 4:1453-1463, 1996)), модель C α , которая была доступна в PDB. Для применения для МЗ полную молекулярную модель IFN- α 2 получали при помощи МЗ с применением Phaser с координатами C α и данными в PDB, а также уточняли при помощи PHENIX (Adams et al., J Synchrotron Radiat 11:53-55, 2004). Структуру IFN- ω /FabM43 уточняли при помощи PHENIX и выравнивание моделей проводили с использованием COOT (Emsley and Cowtan, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60:2126-2132, 2004). Все остальные кристаллографические расчеты проводились при помощи пакета программ CCP4 (Collaborative Computational project, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 53:240-255, 1994). Прямой угол между доменами переменных и констант рассчитывали при помощи программы RBOW (Stanfield et al., J Mol Biol 357:1566-1574, 2006). Молекулярные графики получали при помощи PyMOL (DeLano, Palo Alto, штат Калифорния, США, Delano-Scientific). Данные по уточнению структуры приведены в табл. 6.

Таблица 6. Параметры кристалла и уточненная статистика

Данные рентгеновской дифракции		
Пространственная группа	P2 ₁	
Размеры элементарной ячейки		
a, b, c (Å)	132,20, 142,48, 107,35	
α , β , γ (°)	90, 90, 101,96	
Содержание асимметричной ячейки	6 комплексов	
Разрешение (Å)	50,00–2,50	(2,56–2,50) ^d
Число измеряемых отражений	357 014	(3,854) ^d
Число уникальных отражений	110,299	(1,929) ^d
Полнота (%)	82,1	(19,1) ^d
Избыток	3,2	(2,0) ^d
R-объединение ^a	0,085	(0,404) ^d
<I/b> (сред.)	10,0	(2,1) ^d
В-фактор (Уилсон) (Å ²)	51,3	
Оптимизация	48,50–2,50	(2,58–2,50)
Разрешение (Å)	23,4/27,7	(36,3/49,9)
R _{cryst} /R _{free} (%) ^b		
Число отражений		
Рабочий/тестовый набор	109,900/1 610	
Число атомов		
Велки	27 056	
Растворитель (вода и т. п.)	1 228	
RMSD длин связей (Å)	0,004	
RMSD углов связей (°)	0,76	
Средние В-факторы (Å ²)		
Белок	35,9	
Растворитель	36,2	
График Рамачандрана ^c		
Благоприятные области (%)	96,4	
Отклоняющееся значение (%)	0,4	

^aR_{merge}= $\sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, где I - интенсивность измеренного отражения, а <I> - средняя интенсивность всех измеренных отражений.

^bR_{cryst}= $\sum |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| / \sum |F_{\text{obs}}|$, где F_{obs} и F_{calc} наблюдаемые и расчетные коэффициенты, а R_{free} вычисляется для набора произвольно выбранных 5% отражений перед уточнением структуры.

^c Построение графика Рамачандрана проводили с помощью программы MolProbity.

Пределы анизотропного разрешения в a*, b* и c* составляют 3,0, 2,5 и 2,5 Å, согласно сервера мас-

штаба анизотропной дифракции (http://_services_mbi_ucla.edu/_anisoscale/).

Статистика данных дифракции для набора данных после анизотропного усечения и масштабирования с помощью этих пределов.

Результаты

Общая структура.

В асимметричной единице есть шесть комплексов IFN ω /FabM43. Все эти комплексы очень похожи. Общая типичная молекулярная структура комплекса IFN ω /FabM43 показана на фиг. 4. На фиг. VH обозначен H; VL обозначен L, а в верхнем левом углу показан IFN ω .

Молекулы IFN ω имеют существенно идентичную конформацию со средним значением $C\alpha$ RMSD меньше, чем 0,35 Å. Молекулярная структура IFN ω представляет собой 3-спиральный пучок, который очень похож на IFN- $\alpha 2$ со средним значением $C\alpha$ RMSD 0,53 Å и почти идентична опубликованной структуре IFN- ω (pdb id 3se4) со значением $C\alpha$ RMSD 0,47 Å и IFN β ($C\alpha$ rmsd 0.85 Å для 94 остатков). Тем не менее, есть некоторые существенные различия между IFN α/ω и IFN- β , потому что петля AB у IFN β короче на один остаток. Молекулы Fab также имеют одинаковые структуры, кроме как для короткого отрезка в CDR-H1 (G₂₆GTF₂₉) (SEQ ID NO: 33), который приобретает несколько различные каркасные конформации.

Эпитоп, паратоп и взаимодействие антитело/антиген M43 распознает конформационный эпитоп, который состоит из остатков петли AB (между R22 и Q40) и остатков K134, M146, M149, K150, F153 и L154 спирали E (табл. 7). Паратоп состоит из остатков от пяти из шести CDR. Остатки паратопа в основном гидрофобные, которые образуют ряд карманов, в которые стыкуются боковые цепи остатков F27, L30, K31 и R33 короткой спирали AB. Взаимодействия антител и антигенов являются по большей части вандерваальсовыми и гидрофобными. Существует только небольшое количество водородных связей между антителом и антигеном, а большинство из них включают взаимосвязи каркас-каркас или боковая цепь-каркас. Несколько остатков F27, L30, K31 и R33 спирали AB учитываются для большинства взаимодействий антитело/антиген. Таким образом, эта область IFN ω по-видимому, является основной частью эпитопа.

Таблица 7. Эпитоп и паратоп антитела M43. Показаны контактные остатки для всех шести комплексов.

Нумерация остатков в соответствии с человеческим IFN ω SEQ ID NO: 1

	ABO	CDP	EFQ	GHR	IJX	KJT
VL:						
	Y31	Y31	Y31	Y31	Y31	Y31
	S33	S33	S33	S33	S33	S33
	Y38	Y38	Y38	Y38	Y38	Y38
	F98	F98	F98	F98	F98	F98
	D99	D99	D99	D99	D99	D99
	Y102	Y102	Y102	Y102	Y102	Y102
VH:				T28		
	F29	F29	F29	F29	F29	F29
	S30	S30	S30	S30		
	S31	S31	S31	S31	S31	S31
		Y32	Y32			Y32
	A33	A33	A33	A33	A33	A33
	G50	G50	G50	G50	G50	G50
			I51			
	I52		I52	I52	I52	I52
	I54	I54				

	F55	F55	F55	F55	F55	F55
	T57	T57	T57	T57	T57	T57
	A58	A58	A58	A58	A58	A58
	N59	N59	N59	N59	N59	N59
	D99	D99	D99	D99	D99	D99
	W101	W101	W101	W101	W101	W101
	Y105	Y105	Y105	Y105	Y105	Y105
IFN- ω						
	R22	R22	R22			R22
	P26	P26	P26	P26	P26	P26
	F27	F27	F27	F27	F27	F27
	L30	L30	L30	L30	L30	L30
	K31	K31	K31	K31	K31	K31
	D32	D32	D32	D32	D32	D32
	R33	R33	R33	R33	R33	R33
	R34	R34	R34	R34	R34	R34
	D35	D35	D35	D35	D35	D35
	Q40		Q40	Q40	Q40	Q40
	K134	K134	K134	K134	K134	K134
	M146	M146	M146	M146	M146	M146
	M149	M149	M149			M149
	K150	K150	K150	K150		K150
	F153	F153	F153	F153	F153	F153
	L154	L154	L154	L154	L154	L154

Все остатки в 3,9 Å связывающих партнеров считаются контактными остатками. Остатки VL и VH антитела имеют последовательную нумерацию.

Режим нейтрализации антител

Кристаллическая структура IFN α/ω в комплексе с IFNAR1 и/или IFNAR2 была недавно зарегистрирована (Thomas et al., Cell 146:621-632, 2011). Сравнение структуры M43/IFN $\alpha4$ и комплекса IFN ω /IFNAR1/IFNAR2 ясно показывает, что тяжелая цепь M43 и IFNAR2 будут накладываться друг на друга. Таким образом, M43 нейтрализует путем блокирования взаимодействия IFNAR2/IFN.

Пример 6. Эпитоп C2595 из кристаллических структуры Fab357 (Fab из C2595) в комплексах с IFN ω T80E или IFN $\alpha4A$.

C2595 (далее C2595 и Fab357 для моноклонального антитела и Fab, соответственно) представляет собой антитело, которое нейтрализует несколько молекул IFN- α человека и IFN ω , полученных из мышечной гибридомы. V участки были клонированы и химеризированы на человеческие тяжелые и легкие цепи (IgG1K изотип) для получения рекомбинантного Fab357. Были определены кристаллические структуры IFN- ω /Fab357 и комплексов IFN- $\alpha4A$ /Fab357.

Материалы и способ

Белки.

Fab357 помеченный His-метками (IgG1/к изотип) и IFN ω человека с мутацией T80E (далее IFN ω T80E. IFN ω и IFN ω с T80E являются синонимами в данном примере) экспрессировали в клетках HEK293F клеток и очищали с помощью аффинной и гель-фильтрационной хроматографии. Белки были в 20 mM Tris pH 7,4, 50 mM NaCl. IFN $\alpha4A$ был получен от компании из Crown Bioscience Inc. в 20 mM Tris pH 7,4, 50 mM NaCl.

Кристаллизация IFN $\alpha4A$ /Fab357 и комплексов IFN ω /Fab357.

Комплекс IFN $\alpha4A$ /Fab357 получали путем смешивания IFN $\alpha4A$ с Fab357 в молярном соотношении 1,05: 1,0, и очищали на колонке с Superdex 200 в 20 mM MES pH 6,5 с 0,1 M NaCl. Очищенный комплекс концентрировали до 5,5 мг/мл. Кристаллы с дифракционными свойствами выращивали в виде сидячей капли, состоящей из одинаковой смеси раствора белка и 20% PEG 3350 и 0,2 M цитрата аммония с высеиванием.

Комплекс IFN ω /Fab357 получали путем смешивания IFN ω с Fab357 в молярном соотношении 1,17: 1,0 (избыток IFN ω), инкубировали при температуре 4°C в течение 2 ч, а комплекс IFN ω /Fab357 очищали на колонке Superdex 200 (GE Healthcare), уравновешенной при помощи 20 mM HEPES pH 7,5, 0,1 M NaCl

и концентрировали до 6,8 мг/мл. Кристаллы, пригодные для рентгеновской дифракции получали из сидячих капель, состоящих из одинаковой смеси белкового комплекса и 100 мМ MES pH 6,5, 18% ПЭГ 3К, 0,2 М LiCl с высеванием.

Регистрация данных рентгеновской кристаллографии и определение структуры.

Для регистрации данных рентгеновской кристаллографии кристаллы IFN α 4A/Fab357 и IFN ω /Fab357 погружали на несколько секунд в синтетический маточный раствор (20% ПЭГ 3350, 0,2 М цитрата аммония, планшет 10/20/11-MMS-A10; 0.1 MES pH 6,5, 18% ПЭГ 3350, 0,2 М LiCl, планшет 12/21/2011-B11 (R), соответственно), добавляли 18% глицерина и замораживали в жидком азоте. Данные дифракции рентгеновских лучей собирали в Advance Photon Source Аргоннской национальной лаборатории и Swiss Light Source, соответственно. Данные рентгенографии обрабатывали с помощью программы XDS. Статистика данных рентгенографического анализа представлена в табл. 8.

Структуру восстанавливали методом молекулярного замещения (МЗ) с помощью Phaser. Моделями поиска для МЗ были кристаллическая структура Fab15 (PDB ID 3NCJ) и IFN ω в комплексе с М43. Структуры уточняли при помощи PHENIX⁵ и выравнивание моделей проводили с использованием COOT. Все другие кристаллографические расчеты проводили с использованием пакета программ CCP4. Молекулярные графики получали при помощи PyMol. Данные по уточнению структуры приведены в табл. 8.

Таблица 8. Параметры кристалла и уточненная статистика

Данные рентгеновской дифракции	IFN α 4A/Fab357	IFN ω /Fab357
Пространственная группа	P6 ₅ 22	C222 ₁
Размеры элементарной ячейки		
a, b, c (Å)	156,07, 122,81, 156,07	70,23
104,33, 155,38		
α , β , γ (°)	90, 120, 90	90, 90, 90
Содержание асимметричной ячейки	1 комплекс	1 комплекс
Разрешение (Å)	50,00–2,30 (2,36–2,30)	50,00–2,20
(2,26–2,20)		
Число измеряемых отражений	260 405 (19 875)	193 190
(13 207)		
Число уникальных отражений	39 577 (2 888)	29 394
(2 143)		
Полнота (%)	99,9 (100,0)	99,9 (99,9)
Избыток	6,6 (6,9)	6,6 (6,2)
R-объединение ^a	0,059 (0,618)	0,056
<I/σ> (сред.)	20,0 (3,3)	0,539
В-фактор (Уилсон) (Å ²)	45,2	45,2
Оптимизация		
Разрешение (Å)	39,30–2,30 (2,36–2,30)	43,31–2,20 (2,26–2,20)
R _{cryst} /R _{free} (%) ^b	19,3/23,6 (25,4/31,1)	20,0/25,0 (22,1/28,3)
Число отражений		
Рабочий/тестовый набор	37 572/1 998	27,390/2,000
Число атомов		
Белки	4 555	3 785
Растворитель (вода и т. п.)	198	180
RMSD длин связей (Å)	0,008	0,005
RMSD углов связей (°)	1,12	0,95
Средние В-факторы (Å ²)		
Белок	48,4	45,6
Растворитель	42,3	43,3
График Рамачандрана ^c		
Благоприятные области (%)	96,2	96,5
Отклоняющееся значение (%)	0,4	0,2
Значение столкновения всех атомов	9,8	8,9

$R_{\text{merge}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, где I - интенсивность измеренного отражения, а $\langle I \rangle$ - средняя интенсивность всех измеренных отражений.

$R_{\text{cryst}} = \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum |F_{\text{obs}}|$, где F_{obs} и F_{calc} - наблюдаемые и расчетные коэффициенты, а R_{free} вычисляется для набора произвольно выбранных 5% отражений перед уточнением структуры.

Построение графика Рамачандрана проводили с помощью программы MolProbity.

Результаты

Общая структура.

В асимметричной единице в обоих структурах есть один комплекс антиген/антитело. Общие типичные молекулярные структуры представлены на фиг. 5. Молекула Fab очень похожа в обоих кристаллах. Конформация IFN α 4A очень похожа на конформацию в IFN α 4A/FabM88. Для структуры IFN ω /Fab357, модель IFN ω включает в себя только остатки R22-P39 и L118-L154. Недостающие остатки IFN ω не являются результатом нарушения в кристалле, поскольку кристаллическая оболочка исключает их наличие. По-видимому, протеолитическое расщепление IFN ω произошло во время кристаллизации. Было обнаружено доказательство того, что часть одного и того же комплекса, находившегося в холодильном шкафу, перенесла незначительную деградацию протеазы, хотя образец не идентичен тому, который был определен в кристалле (данные не показаны). Тем не менее, связывающие участки IFN ω размещены хорошо.

Эпитоп, паратоп и взаимодействие антитело/антиген C2595 распознает почти идентичный конформационный эпитоп как на IFN α 4A, так и на IFN ω , который состоит из остатков петли AB (между R/G22 и R/H34) и остатков V143, M/A146, E147 и R/K150 спирали E (табл. 9). Паратоп состоит из остатков четырех из шести CDR (CDR-L1, L3, H2 and H3). Остатки паратопа в основном гидрофобные, которые образуют ряд карманов, в которые стыкуются боковые цепи остатков F27, L30, K31 и R33 короткой спирали AB. Взаимодействия антител и антигенов являются по большей части вандерваальсовыми и гидрофобными. Существует только небольшое количество водородных связей между антителом и антигеном, а большинство из них включают взаимосвязи каркас-каркас или боковая цепь-каркас. Несколько остатков F27, L30, K31 и R33 спирали AB учитываются для большинства взаимодействий антитело/антиген. Таким образом, эта область IFN ω по-видимому, является основной частью эпитопа.

Таблица 9. Эпитоп и паратоп антитела C2595. Показаны контактные остатки для всех шести комплексов. Нумерация остатков в соответствии с IFN ω SEQ ID NO: 1 и IFN- α 4a с SEQ ID NO: 19.

	Паратоп		Эпитоп	
	IFN ω /Fa b357	IFN α 4A/Fab357	IFN ω	IFN α 4A
VL:				G22
	H31	H31	R23	R23
	N33	N33	I24	I24
	Y37	Y37	S25	S25
	N96	N96	P26	H26
	L97	L97	F27	F27
	L99	L99		C29
			L30	L30
VH:			K31	K31
	I50	I50	R33	R33
	T52		R34	H34
	Y57	Y57		V143
	T58	T58	M146	A146
	Y59	Y59	E147	E147
		E101	K150	R150
	G103	G103		
	G104	G104		
	N105	N105		
	Y106	Y106		
	Y108	Y108		

Все остатки в 3,9 Å связывающих партнеров считаются контактными остатками. Остатки VL и VH антитела имеют последовательную нумерацию.

Режим нейтрализации антител. C2595 нейтрализует путем блокирования взаимодействия IFNAR2/IFN.

Пример 7. Эпитоп M88, полученный из кристаллической структуры антитела M88 к анти-IFN в комплексе с IFN α 4A.

Кристаллическая структура антитела M88 к анти-IFN в комплексе с IFN α 4A была определена до 2,5 Å. Основной эпитоп является спиральным элементом A19-D35 петли AB IFN. Связывание M88 предотвратит взаимодействия с IFNAR2. Таким образом, M88 является блокатором IFNAR2. Структура проливает свет на перекрестную реактивность связывания M88.

IFWM88 (далее M88 и FabM88 для моноклонального антитела и Fab, соответственно) представляет собой антитело, нейтрализующее человеческий IFN α . Моноклональное антитело M88 показывает связывание с несколькими подтипами IFN α , но незначительное связывание с человеческим IFN ω .

Материалы и способы

Белки.

FabM88 помеченный His-метками (IgG1/каппа изотип) клонировали и экспрессировали в клетках HEK293F и очищали с помощью аффинной и гель-фильтрационной хроматографии. Fab были получены в 20 mM Tris pH 7,4, 50 mM NaCl. IFN α 4A был получен от компании из Crown Bioscience Inc. (в 20 mM Tris pH 7,4, 50 mM NaCl).

Кристаллизация IFN α 4A/FabM88 комплекса.

Комплекс получали путем смешивания IFN α 4A с FabM88 в молярном соотношении 1,05: 1,0 (избыток IFN α 4A), инкубировали при температуре 4°C в течение одного часа, в 20 раз разбавляли 20 mM Tris pH 8,0, 10% глицерина, 0,1 M NaCl, затем концентрировали до 9,25 мг/мл при помощи отсечки Amicon-Ultra 10 кД. Начальную кристаллизацию проводили при помощи наборов IH1, IH2 и ПЭГ (Qiagen). Кристаллизацию комплекса проводили диффузией из газовой фазы при 20°C с использованием робота Oryx4 (Douglas Instruments). Кристаллы получали из IH2 # E12-25% ПЭГ 3K, 0,2 M цитрата аммония. Эти первоначальные кристаллы использовали для подготовки семян для кристаллизации. Для улучшения качества кристалла, комплекс IFN α 4A/FabM88 очищали на колонке Superdex 200 (GE Healthcare), уравновешенной при помощи 20 mM MES pH 6,5, 0,1 M NaCl, 10% глицерина и концентрировали до 8,16 мг/мл. Кристаллы, пригодные для X-дифракции получали из 28% 3K, 0,2M цитрата аммония с МПК высеванием, как описано в публикации (Obmolova et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66:927-935, 2010).

Регистрация данных рентгеновской кристаллографии и определение структуры.

Для получения данных рентгеновского структурного анализа один кристалл комплекса погружали на несколько секунд в маточный раствор с добавлением 20% глицерина и мгновенно замораживали в потоке азота при 95 K. Данные о дифракции рентгеновских лучей собирали и обрабатывали с помощью микрофокусного генератора рентгеновских лучей Rigaku MicroMaxTM-007HF, снабженного конфокальной оптикой OsmicTM VariMaxTM, детектором Saturn 944 CCD и системой криоохлаждения X-streamTM 2000 (Rigaku, Техас). Интенсивность дифракции измеряли при вращении кристалла свыше 235° на каждый поворот на половину градуса. Данные рентгенографии обрабатывали с помощью программы XDS. Статистика данных рентгенографического анализа представлена в табл. 10.

Структуру восстанавливали методом молекулярного замещения (M3) с помощью Phaser. Моделями поиска для M3 были кристаллическая структура Fab15 (PDB ID 3NCJ) и IFN α 2 (PDB ID 1RH2, модель C α , которая была доступна в PDB. Для применения для M3 полную молекулярную модель IFN α 2 получали при помощи M3 с применением Phaser с координатами C α . и данными в PDB, а также уточняли при помощи PHENIX. Структуру IFN α 4A/FabM88 уточняли при помощи PHENIX и выравнивание моделей проводили с использованием COOT. Все другие кристаллографические расчеты проводили с использованием пакета программ CCP4. Прямой угол между доменами переменных и констант рассчитывали при помощи программы RBOW. Все молекулярные графики получали при помощи PyMol. Данные по уточнению структуры приведены в табл. 10.

Таблица 10. Параметры кристалла и уточненная статистика

Параметры кристалла		
Пространственная группа	P1	
Размеры элементарной ячейки		
a, b, c (Å)	41,92, 102,53, 84,71	
α , β , γ (°)	97,68, 98,54, 90,12	
Содержание асимметричной ячейки	2 комплексов	
V _m (Å ³ /Da)	2,62	
Данные рентгенографического анализа		
Разрешение (Å)	50–2,5	(2,58– 2,50) ^a
Количество измеренных отражений	83 604	(1 217)
Количество уникальных отражений	34 097	(588)
Полнота (%)	72,1	(16,7) ^b
Избыток	2,5	(2,1)
R-объединение	0,43	(0,452)
<I/σ>	18,0	(1,9)
B-фактор (график Уилсона) (Å ²)	43,8	

Оптимизация		
Разрешение (Å)	30,6–2,5	(2,58–2,50)
Число рефлексов, использованных при оптимизации	34 095	(640)
Полнота (%)	72,2	
Число всех атомов	8 844	
Число молекул воды	149	
Rcryst (%)	21,1	(42,8)
Rfree (%)	27,3	(56,6)
RMSD длин связей (Å)	0,003	
RMSD углов связей (°)	0,67	
RMSD B-фактора основной цепи (Å ²)	6,6	
Средний B-фактор (Å ²)	47,4	
MolProbity [25]		
Значение столкновения	9,8	
Плохие ротамеры (%)	3,9	
Предпочтительное значение Рамачандрана (%)	94,4	
Отклоняющееся значение Рамачандрана (%)	0,6	
Сβ отклонение >0,25 Å	0	

^a Значения для оболочки высокого разрешения приведены в скобках.

^b Низкая завершенность, потому что оболочки высокого разрешения содержат отражения только в углах детектора.

Результаты

Общая структура.

Общая молекулярная структура комплекса IFN α 4A/FabM88 показана на фиг. 6. В асимметричной единице есть два комплекса. Молекулярные модели для двух независимых молекул IFN α 4A включают остатки 7-102 и 113-160 для одного и 12-102 и 113-160 для другого. Соединительная петля между остатками 103 и 112 в обеих молекулах разупорядочена. Две молекулы Fab содержат остатки от 1 до 212 для легкой цепи и от 1 до 221 для тяжелой цепи. С-концевой маркер 6xHis и межцепочечные дисульфидные связи разупорядочены.

Две молекулы IFN α 4A имеют существенно идентичную конформацию со средним значением rmsd 0,132 Å для 122 C α атомов. Две молекулы Fab также имеют одинаковые структуры со средним значением rmsd меньше, чем 0,5 Å для всей Fab. Интересно, что две Fab имеют почти идентичные углы изгиба (172 и 174 градусов) в соответствии с RBOW.

Структура IFN α .

Молекулярная структура IFN α 4A (фиг. 7A) очень похожа на IFN α 2 со средним значением C α rmsd от 0,5 до 0,7 Å. Она также очень похожа на структуру IFN ω (фиг. 7B, C α rmsd 0,61 Å для 112 остатков) и IFN β (фиг. 7C, C α rmsd 0,85 Å для 94 остатков). Есть некоторые существенные различия между IFN α / ω и IFN β из-за одного короткого остатка в АВ петле IFN β (фиг. 7D).

Эпитоп, паратоп и взаимодействие антитело/антиген.

M88 распознает конформационный эпитоп, который состоит из остатков петли АВ (между A19 и D35) и остатков V143, A146, E147 и R150 спирали E (табл. 11). Паратоп состоит из остатков из всех шести CDR. Остатки паратопа в основном гидрофобные, которые образуют ряд карманов, в которые стыкуются боковые цепи остатков F27, L30, K31 и R33 короткой спирали АВ. Взаимодействия антител и антигенов являются по большей части вандерваальсовыми и гидрофобными. Существует только небольшое количество водородных связей между антителом и антигеном, а большинство из них включают взаимодействия каркас-каркас или боковая цепь-каркас. Несколько остатков F27, L30, K31 и R33 спирали АВ учитываются для большинства взаимодействий антитело/антиген. Таким образом, эта область IFN α 4A составляет основную часть эпитопа. F50 из VL не находится в прямом контакте с антигеном в структуре. Но его боковая цепь находится в непосредственной близости от Y32 (VL) и P105 (VH), которые участвуют в связывании. Возможно, этот остаток был выбран за его поддержку локальной структуры CDR-H3 в пользу связывания.

Таблица 11

Эпитоп и паратоп антитела M88					
VL	ПАРАТОП		ЭПИТОП		
	LHI	ABJ	IFNa4A	LHI	ABJ
	Y32	Y32		A19	A19
	S91	S91		H26	
	Y92	Y92		F27	F27
	S93	S93		L30	L30
	T94	T94		K31	K31
	L96	L96		D32	D32
VH				R33	R33
	W47	W47		H34	H34
	G50	G50		D35	D35
	I51	I51		V143	V143
	I52			A146	A146
	F55	F55		E147	E147
	N59	N59		M149	
	H99	H99		R150	R150
	L100	L100		S153	
	G101	G101			
	Y102	Y102			
	A103	A103			
	F104	F104			
	P105	P105			
	D106	D106			

Все остатки в 3,9 Å связывающих партнеров считаются контактными остатками. Остатки VL и VH антитела имеют последовательную нумерацию. LHI и ABJ представляют два комплекса.

Дизайн библиотек на основе структуры для улучшения перекрестной реактивности и аффинности M88 прочно связывается с рядом подтипов IFN α , но слабо связывается IFN ω . Две стратегии возможны на основе текущей сложной структуры, а также молекулярного моделирования с использованием структуры IFN ω . Одна стратегия заключается в расширении CDR-L1 (библиотеки extL1) путем создания дополнительных взаимодействий антитело/антиген, сохраняя все текущие контакты в структуре IFN α 4A/M88. Сравнения структуры и последовательностей показывают, что участки поверхности 5 остатков (D32, H34, D35, Y130 и K134) сохранились на 100% среди всех подтипов IFN α (табл. 12).

Таблица 12

	Остатки 32-35		Остатки 130-134	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
IFN α	DRHD	34	YLxEK	36
IFN ω	DRRD	35	YLKEK	37

Четыре из этих 5 остатков также сохраняются, за исключением R34, вместо H34 в IFN ω . CDR-L1 находится далеко от этого хорошо сохраненного участка поверхности. Таким образом, предположили, что более длинный CDR-L1, например, что в зародышевой линии IGKV4-1 (B3), который имеет 6 дополнительных остатков в 3-1-1 канонической структуре, является достаточно длинным, чтобы связаться с этим участком. Чем дольше CDR-L1 будет обеспечивать дополнительные взаимодействия для всех подтипов IFN α и IFN ω , таким образом, улучшая как аффинность, так и расширение специфичности. Последовательность расширенного CDR-L1 можно оптимизировать путем фагового дисплея из библиотеки. Дизайн библиотеки фагового дисплея приведен в табл. 13. Позиции extL1, обращенные в противоположную сторону от антигена не рандомизируют. Позиция F50 VL является единственным не-человеческим зародышевым остатком. Структурно он появляется для обеспечения поддержки для CDR-L3. Таким образом, эта позиция также рандомизирована для оптимизации своей поддержки расширенного CDR-L1.

Таблица 13

	Последовательность	SEQ ID NO:
M88	SQSI SYL	38
M32	SQSVLYSSNNKNYL	39
extL1	SQSVLXSXXNKNYL	40

X представляет собой любую аминокислоту.

Режим нейтрализации антител.

Кристаллическая структура IFN α / ω в комплексе с IFNAR1 и/или IFNAR2 была недавно зарегистрирована (Thomas et al., Cell 146:621-632, 2011). На фиг. 8 изображена накладка M88/IFN α 4 на комплекс IFN ω /IFNAR1/IFNAR2. Очевидно, что HC и IFNAR2 будут накладываться друг на друга. Таким образом, M88 нейтрализует путем блокирования взаимодействия IFNAR2/IFN.

Пример 8. Минимальный эпитоп IFN α и IFN ω обеспечивает широкую нейтрализующую IFN α /IFN ω активность.

Кристаллические структуры IFN ω T80E/FabM43, IFN α 4A/FabM88, IFN α 4A/Fab357 (c2595) и IFN ω /Fab357 определяют минимальный общий эпитоп, необходимый для широкой нейтрализации IFN ω и множества подтипов IFN α (табл. 14). Анализы взаимодействия антитело/антиген четырех кристаллических структур указывают, что три остатка в петле AB в IFN α 4a (SEQ ID NO: 19) и IFN ω (SEQ ID NO: 1), F27, L30 и R33 образуют обширные контакты с антителами. Эти остатки, вероятно, обеспечить доминирующие вклады в связывание антител. Таким образом, F27, L30 и R33 являются ключевыми элементами эпитопа кросс-нейтрализации IFN ω /IFN α .

Конформационный эпитоп состоит из остатков петли AB (остатки 22-34 IFN ω с SEQ ID NO: 1 и IFN α 4a с SEQ ID NO: 19) с коротким спиральным сегментом (27-29) и остатков в спирали E (134-154 это те же остатки спирали E для IFN ω и всех подтипов IFN α , кроме IFN α 2, который представляет собой 133-153). В частности, позиции P26, F27, L30, K31, R33 и H34 IFN ω с SEQ ID NO: 1 и остатки H26, F27, L30, K31, R33 и H34 IFN α 4a с SEQ ID NO: 19, определяются нейтрализующими антителами. Эти остатки в значительной степени сохраняются между различными подтипами IFN α и IFN ω , таким образом, учитывая кросс-реактивность и дифференциальную специфику этих антител, несмотря на то, что они происходят из разных источников. Дополнительные остатки эпитопа R22, R23, I24, S25, D32, D35, M149, K150 или L154 IFN ω и остатки A19, G22, R23, I24, S25, H26, F27, C29, L30, K31, D32, R33, H34, D35, V143, A146, E147, M149, R150 или S153 IFN α 4a.

Таблица 14

Эпитопы			
M43 onTFN ω	M88 onTFN α 4a	C2595 on TFN α 4a	C2595 on TFN ω
	A19		
R22		G22	
		R23	R23
		T24	T24
		S25	S25
P26	H26	H26	P26
F27	F27	F27	F27
		C29	
L30	L30	L30	L30
K31	K31	K31	K31
D32	D32		
R33	R33	R33	R33
R34	H34	H34	R34
D35	D35		
Q40			
K134			
	V143	V143	
M146	A146	A146	M146
	E147	E147	E147
M149	M149		
K150	R150	R150	K150
F153	S153		
L154			

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с остатками F27, L30 и R33 SEQ ID NO: 1 интерферона омега (IFN ω) человека, где антитело нейтрализует активность IFN ω , IFN α B2, IFN α C, IFN α F, IFN α G и IFN α J1, и включает аминокислотную последовательность вариабельного участка тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 27 и аминокислотную последовательность вариабельного участка легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 27.

участка легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 28.

2. Антитело по п.1, которое связывается с IFN α A, IFN α H2, IFN α K, IFN α WA и IFN α 4a и нейтрализует их активность.

3. Антитело по п.2, в котором активность представляет собой ингибирование экспрессии секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под контролем индуцируемого интерфероном промотора ISG54 в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции 2 (STAT2), регуляторный фактор интерферона 9 (IRF9) и SEAP.

4. Антитело по п.3, которое нейтрализует активность IFN ω со значением IC₅₀ между около 0,9 $\times 10^{-9}$ М и около 1,85 $\times 10^{-8}$ М.

5. Антитело по п.4, которое связывается с IFN ω с константой диссоциации (K_D) между около 0,3 $\times 10^{-9}$ М и около 1,5 $\times 10^{-9}$ М, где K_D измеряют с использованием технологии SPR с ProteOn (Bio-Rad, г. Геркулес, штат Калифорния), с загрузкой антитела на чип, связанный антителами в течение 2 мин при скорости потока 30 мкл/мин, промывкой рабочим буфером в течение 2 мин при скорости потока 50 мкл/мл и связыванием рекомбинантных антигенов IFN в 5 различных концентрациях в диапазоне от 100 до 1,23 нМ с разбавлением 1:3 в течение 3 мин и разделением в течение 10 мин, оба при скорости потока 50 мкл/мл.

6. Антитело по п.2, которое нейтрализует активность индуцированного вирусом лейкоцитарного интерферона, причем активность индуцированного вирусом лейкоцитарного интерферона представляет собой высвобождение IP-10 в цельной крови, индуцированное 100 Ед/мл интерферона.

7. Антитело по п.6, которое нейтрализует указанную активность более чем на 50% в присутствии 50 мкг/мл антитела.

8. Антитело по п.2, которое не связывает и не нейтрализует интерферон- β (IFN β).

9. Антитело по п.2, которое представляет собой человеческое, гуманизованное или адаптированное к человеку антитело.

10. Антитело по п.9, отличающееся тем, что имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

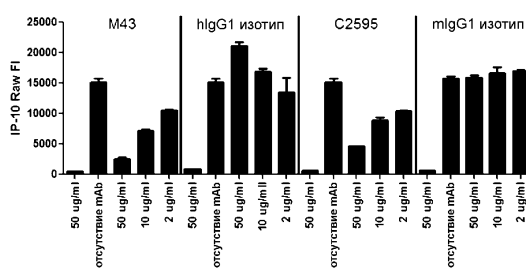
11. Биспецифическое антитело, которое связывается с остатками F27, L30 и R33 SEQ ID NO: 1 интерферона омега (IFN ω) человека, где антитело нейтрализует активность IFN ω , IFN α B2, IFN α C, IFN α F, IFN α G и IFN α J1, и включает аминокислотную последовательность вариабельного участка тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 27 и аминокислотную последовательность вариабельного участка легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 28.

12. Антитело по п.11, которое связывается с BLYS, CD40L, IL-6, CD27, BDCA2 или субъединицей p40 IL-12 или IL-23.

13. Антитело по п.1, которое не связывается с IFN α D человека или не нейтрализует его.

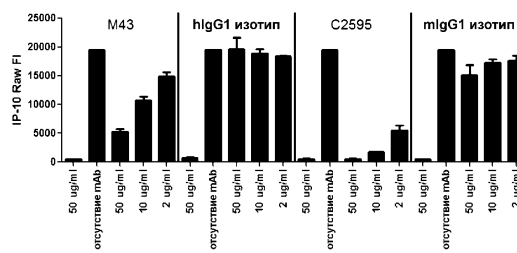
14. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики заболевания, связанного с повышенной продукцией IFN ω , содержащая эффективное количество антитела по любому из пп.1-13 и фармацевтически приемлемый носитель.

Высвобождение IP-10, индуцированное человеческим лейкоцитарным интерфероном в присутствии антагониста моноклональных антител

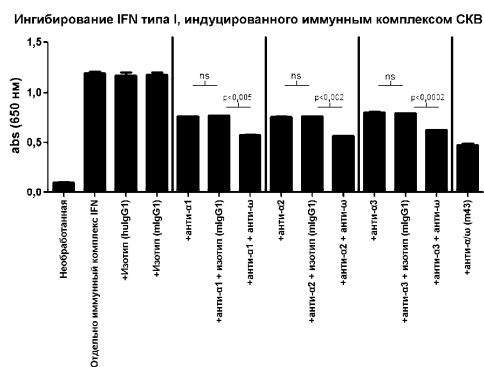


Фиг. 1А

Высвобождение IP-10, индуцированное IFN- ω в присутствии антагониста моноклональных антител

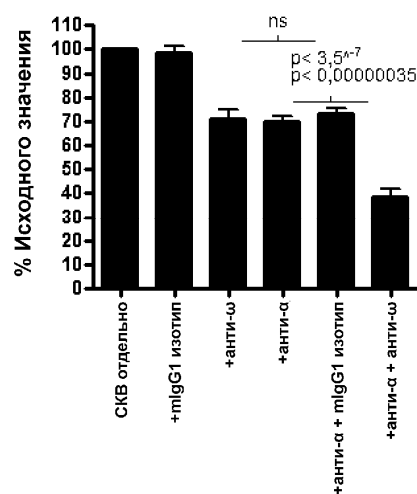


Фиг. 1В

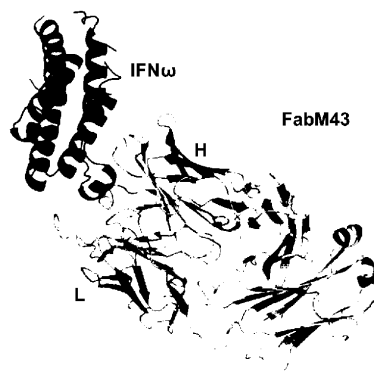


Фиг. 2

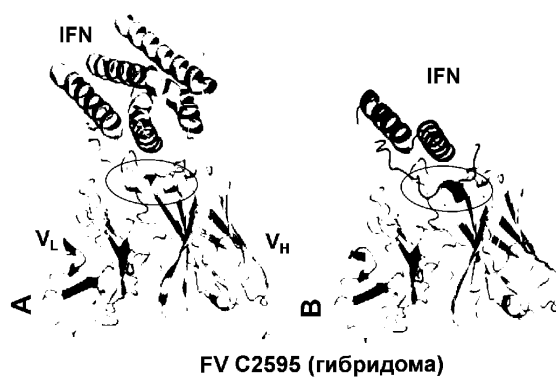
Композитный базовый % от 9 генов,
вызываемых интерферон типа I



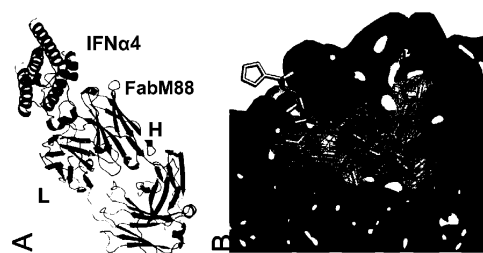
Фиг. 3



Фиг. 4



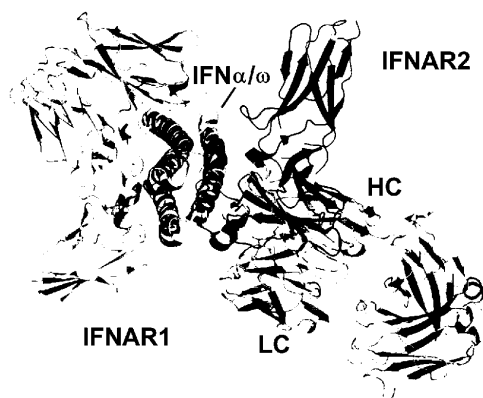
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

