

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190378 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.09.06

(22) Дата подачи заявки
2019.09.18

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ IFNAR1 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) PCT/CN2018/106157

(32) 2018.09.18

(33) CN

(86) PCT/CN2019/106412

(87) WO 2020/057541 2020.03.26

(71) Заявитель:
АЙ-МАБ БИОФАРМА (ХАНЧЖОУ)
КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:
Цао Вэй, Сюй Вэйли (CN)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены антитела или их фрагменты, обладающие специфичностью связывания по отношению к белку субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1). В различных примерах антитела или их фрагменты содержат CDR VH и VL, описанные в настоящем документе, или их варианты. Кроме того, предложены способы применения указанных антител или их фрагментов для лечения аутоиммунных заболеваний и нарушений.

A1

202190378

202190378

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ IFNAR1 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Системная красная волчанка (СКВ), также известная как волчанка, представляет собой аутоиммунное заболевание, при котором иммунная система организма по ошибке атакует здоровые ткани в различных частях организма. Часто встречающиеся симптомы включают боль и отек суставов, лихорадку, боль в грудной клетке, выпадение волос, язвы во рту, увеличение лимфатических узлов, утомляемость и красную сыпь, наиболее часто появляющуюся на лице. Часто бывают периоды заболевания, называемые обострениями, и периоды ремиссии, когда симптомы немногочисленны.

Причины СКВ неясны. Ее механизм включает иммунный ответ аутоантител против собственных тканей организма. Наиболее часто встречаются антинуклеарные антитела, которые вызывают воспаление. Способы излечить СКВ не существует. Лекарственные средства включают НПВС, кортикостероиды, иммунодепрессанты, гидроксихлорохин и метотрексат. СКВ существенно повышает риск сердечно-сосудистых заболеваний, которые являются наиболее распространенной причиной смерти.

Интерфероны I типа, в особенности ИФН- α и ИФН- β , привлекают внимание из-за своей роли в патогенезе СКВ и других аутоиммунных и воспалительных синдромах. Посредством сигнального пути с участием общего рецептора (IFNAR) эти плейотропные цитокины влияют почти на все аспекты врожденного и приобретенного иммунного ответа, включая повышение активности МНС и костимулирующих соединений, а также продукцию факторов выживаемости В-клеток (BAFF, APRIL) антигенпрезентирующими клетками, в завершение приводящую к размножению аутореактивных Т- и В-клеток. Особое значение для патогенеза волчанки имеет индукция ИФН I Типа в стерильных условиях за счет вовлечения эндосомальных Toll-подобных рецепторов (TLR) посредством собственных нуклеиновых кислот. Создание способов лечения на основе блокирующих реагентов против множественных ИФН- α и одиночного ИФН- β , или их общего рецептора, представляет большой интерес.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены антитела или их фрагменты, обладающие специфичностью связывания по отношению к белку субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1), а также биспецифичные антитела, обладающие специфичностью к IFNAR1 и еще одному антигену, например, BAFF. Эти антитела и фрагменты можно применять при лечении аутоиммунных заболеваний, например, системной красной волчанки.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью к белку субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1), причем указанное антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую области, определяющие комплементарность, тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую области, определяющие комплементарность, легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбраны из группы, состоящей из: (a) HCDR1: DYMH (SEQ ID NO: 77), HCDR2: RIDPEDGETKYAPKFQG (SEQ ID NO: 78) или RIDPEDAETKYAPKFQG (SEQ ID NO:79), HCDR3: GGNFYVMDY (SEQ ID NO: 80), LCDR1: KASQNVGTNVV (SEQ ID NO: 81), LCDR2: SASYRVS (SEQ ID NO: 82) и LCDR3: QQKNNYPYT (SEQ ID NO: 83); и (b) HCDR1: DYYIH (SEQ ID NO: 92), HCDR2: RIDPEDGETKYAPKFQG (SEQ ID NO: 93) или RIDPEDAETKYAPKFQG (SEQ ID NO:94), HCDR3: YHGYWALDY (SEQ ID NO: 95), LCDR1: KTSQNVGTNVA (SEQ ID NO: 96), LCDR2: STSYRYS (SEQ ID NO: 97) и LCDR3: HQYFSYPYT (SEQ ID NO: 98).

В некоторых вариантах реализации HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой HCDR1: DYMH (SEQ ID NO: 77), HCDR2: RIDPEDAETKYAPKFQG (SEQ ID NO:79), HCDR3: GGNFYVMDY (SEQ ID NO: 80), LCDR1: KASQNVGTNVV (SEQ ID NO: 81), LCDR2: SASYRVS (SEQ ID NO: 82) и LCDR3: QQKNNYPYT (SEQ ID NO: 83).

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую одну или более из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, и 84-85 (например, SEQ ID NO:85), или пептид, обладающий по меньшей мере 90%

идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, и 84-87 (например, SEQ ID NO:85). В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую одну или более из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, и 88-91 (например, SEQ ID NO:88), или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, и 88-91 (например, SEQ ID NO:88). Переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи, приведенные в настоящем документе, содержат области CDR, приведенные выше.

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах реализации HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой HCDR1: DYYIH (SEQ ID NO: 92), HCDR2: RIDPEDAETKYAPKFQG (SEQ ID NO:94), HCDR3: YHGYWALDY (SEQ ID NO: 95), LCDR1: KTSQNVGTNVA (SEQ ID NO: 96), LCDR2: STSYRYS (SEQ ID NO: 97) и LCDR3: HQYFSYPYT (SEQ ID NO: 98).

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую одну или более из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73, и 99-102 (например, SEQ ID NO:100), или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73, и 99-102 (например, SEQ ID NO:100).

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую одну или более из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74, и 103-106 (например, SEQ ID NO:105), или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74, и 103-106 (например, SEQ ID NO:105).

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105.

- 5 В еще одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью к белку субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1), причем указанное антитело или его фрагмент могут связываться с одним или более из аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из H273, L274, Y275, K276 и K278 белка IFNAR1.
- 10 В некоторых вариантах реализации указанное антитело или его фрагмент по формуле изобретения может связываться с по меньшей мере двумя из аминокислотных остатков, выбранных из указанной группы, например, K276 и K278. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент по формуле изобретения могут связываться с по меньшей мере тремя из аминокислотных остатков, выбранных из указанной группы,
- 15 например, H273, K276 и K278; L274, K276, и K278; Y275, K276 и K278; или Y275, K276 и K278. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент по формуле изобретения может связываться по меньшей мере с четырьмя, пятью или всеми аминокислотными остатками, выбранными из указанной группы.

- Кроме того, в одном варианте реализации предложена бифункциональная молекула,
- 20 содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к белку субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1), и второй фрагмент, обладающий специфичностью ко второму белку, причем первый антигенсвязывающий фрагмент содержит фрагмент антитела согласно настоящему изобретению.

- 25 В некоторых вариантах реализации второй фрагмент содержит пептид эдратид (hCDR1) или TACI-Ig. В некоторых вариантах реализации второй фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к белку, выбранному из группы, состоящей из BAFF, CD20, CD22, CTLA4, ИЛ-6, CXCL13 и C5. В некоторых вариантах реализации второй фрагмент представляет собой антигенсвязывающий
- 30 фрагмент, обладающий специфичностью к белку фактора выживаемости В-клеток человека (BAFF).

В некоторых вариантах реализации бифункциональная молекула находится в формате, включающем In полноценное антитело, слитое с двумя одноцепочечными фрагментами (scFv) или двумя Fab-фрагментами (как показано в качестве формата 1 в настоящем документе). В некоторых вариантах реализации указанный второй фрагмент содержит

5 антигенсвязывающий фрагмент белимумаба.

Кроме того, предложены варианты применения и способы для антител и фрагментов, описанных в настоящем документе. Например, антитела и фрагменты, описанные в настоящем документе, можно применять для подавления иммунного ответа или лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у пациента, нуждающегося в этом.

10 В некоторых вариантах реализации аутоиммунное заболевание или нарушение выбраны из группы, состоящей из диабета 1 типа, ревматоидного артрита (РА), псориаза/псориатического артрита, рассеянного склероза, системной красной волчанки (волчанки), воспалительного заболевания кишечника, болезни Аддисона, болезни Грейвса, синдрома Шёгрена, тиреоидита Хашимото, миастении гравис, васкулита,

15 злокачественной анемии и целиакии. В некоторых вариантах реализации аутоиммунное заболевание или нарушение представляет собой системную красную волчанку.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **фиг. 1А-В** показано, что антитела 8G11Н и 485G10Н блокировали экспрессию репортерного гена, индуцированную ИФН α 2b, с эффективностью, сопоставимой с

20 эффективностью соответствующих химерных антител.

На **фиг. 2А-В** показано, что антитела 8G11Н и 485G10Н купировали ингибирование пролиферации клеток Daudi, опосредованное ИФН α 2b, в зависимости от дозы.

На **фиг. 3** показано, что 8G11Н и 485G10Н ингибировали секрецию IP-10 культурой нормальных МПК, индуцированную рекомбинантным ИФН α 2b, в зависимости от дозы.

25 На **фиг. 4** показано, что антитела 8G11Н и 485G10Н эффективно ингибировали дифференцировку дендритных клеток *in vitro*, на основании значимого снижения экспрессии маркеров поверхности дифференцированных клеток CD38 и CD86.

На **фиг. 5** показано, что антитела 8G11Н и 485G10Н эффективно ингибировали дифференцировку дендритных клеток *in vitro*, что приводило к нарушению ответа в

MLR, опосредованной дифференцированными клетками, на основании снижения продукции ИФН- γ CD4⁺ Т-клетками.

5 **На фиг. 6** показано, что гуманизированные моноклональные антитела 8G11H и 485G10H значимо ингибировали развитие дендритных клеток, опосредованное плазмой пациентов с СКВ в системе *in vitro*.

На фиг. 7 изображена схема четырех спроектированных форматов биспецифичного антитела против IFNAR/BAFF (Bi-BFINR).

10 **На фиг. 8** показано, что биспецифичное антитело обладало активностью в отношении связывания с IFNAR-1, аналогичной активности антитела 8G11, и активностью в отношении связывания BAFF, сопоставимой с активностью белимумаба.

На фиг. 9А-В показано, что антитело Bi-BFINF обладало активностью в отношении блокирования сигнального пути ИФН α 2b, сопоставимой с активностью 8G11 (А); антитело Bi-BFINF демонстрировало улучшенную активность в отношении к блокировке BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток (В).

15 **На фиг. 10А** показаны профили времени-концентрации 485G10H1L3 у 2 яванских макаков.

На фиг. 10В показаны профили времени-концентрации 8G11H2L1 у 2 яванских макаков.

На фиг. 11А показана экспрессия CD11C, CD38, CD86, МНС I класса, МНС II класса и IFN-альфа R1 посредством FACS после введения через 24 ч, 48 ч и 72 ч.

20 **На фиг. 11В** показаны уровни неоптерина обезьян, бета-2-микроглобулина и СРБ через 24 ч, 48 ч и 72 ч после введения.

На фиг. 11С показаны уровни экспрессии сигнатур генов, индуцируемых ИФН I типа, в МПК обезьяны через 24 ч, 48 ч и 72 ч после введения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Следует отметить, что формы единственного числа, относящиеся к одному или более объектам, например, "антителу", о одно или более антител. Фактически, формы единственного числа, а также термины "один или более" и "по меньшей мере, один" можно использовать здесь на равных основаниях.

В настоящем документе термин «антитело» или «антигенсвязывающий полипептид» относится к полипептиду или полипептидному комплексу, специфически распознающему антиген и связывающемуся с ним. Антитело может представлять собой целое антитело и любой антигенсвязывающий фрагмент или одиночную цепь антитела. Таким образом, термин «антитело» включает любой белок или пептид, содержащий молекулу, содержащую по меньшей мере фрагмент молекулы иммуноглобулина, обладающий биологической активностью связывания с антигеном. Примеры таких фрагментов включают область, определяющую комплементарность (CDR) тяжелой или легкой цепи или их лиганд-связывающий фрагмент, переменную область тяжелой или легкой цепи, константную область тяжелой или легкой цепи, каркасную (FR) область или любой их фрагмент, или по меньшей мере один фрагмент связывающего белка, но не ограничиваются ими.

Термины «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» в настоящем документе представляют собой фрагмент антитела, например, $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ и т.п. Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознает интактное антитело. Термин «фрагмент антитела» включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин «фрагмент антитела» также включает любой синтетический белок или белок, полученный с помощью генной инженерии, действующий аналогично антителу, путем связывания со специфическим антигеном с образованием комплекса.

Термин «одноцепочечный переменный фрагмент» или "scFv" относится к гибридному белку переменных областей тяжелой (V_H) и легкой цепей (V_L) иммуноглобулинов. В некоторых аспектах эти области соединены коротким пептидным линкером, содержащим от десяти до приблизительно 25 аминокислот. Этот линкер обычно богат

глицином (в целях гибкости), а также серином или треонином (в целях растворимости), и может соединять N-конец V_H с C-концом V_L или наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и внедрение линкера. Молекулы scFv известны в данной области и описаны, например, в патенте США 5892019.

Термин "антитело" охватывает различные классы полипептидов, которые могут различаться с биохимической точки зрения. Специалисты в данной области техники должны принимать во внимание, что тяжелые цепи делятся на гамма-, мю-, альфа-, дельта- или эpsilon-цепи (γ , μ , α , δ , ϵ), внутри которых существуют подклассы (например, γ 1- γ 4). Это является природой данной цепи, которая определяет «класс» антитела, например, IgG, IgM, IgA, IgG или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅ и т.д. хорошо изучены и известно, что они характеризуются функциональной специализацией. Квалифицированный специалист легко различает модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов в свете настоящего изобретения и, следовательно, входят в рамки настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов в явном виде входят в рамки настоящего изобретения, и последующее обсуждение будет в целом посвящено классу IgG молекул иммуноглобулинов. По отношению к IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 дальтон, и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой приблизительно 53000-70000. Указанные четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в "Y"-конфигурацию, где легкие цепи сгруппированы с тяжелыми цепями, начиная с горловины указанной "Y"-конфигурации и далее на протяжении вариабельной области.

Антитела, антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела или антитела человека, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, Fv с дисульфидными связями (sdFv), фрагменты, содержащие VK- или VH-домен, фрагменты, продуцированные библиотекой экспрессии Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела к

антителам LIGHT, описанным в настоящем документе), но не ограничиваются ими. Иммуноглобулины или молекулы антител согласно настоящему изобретению могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекул иммуноглобулинов.

- 5 Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда (K , λ). Тяжелая цепь каждого класса может связываться с каппа- или лямбда-легкой цепью. В общем случае легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, и "хвостовые" фрагменты двух тяжелых цепей соединены друг с другом посредством ковалентных дисульфидных связей или нековалентных связей, если иммуноглобулины получают с помощью
- 10 гибридом, В-клеток или рекомбинантных клеток-хозяев. В тяжелой цепи аминокислотная последовательность идет от N-концевой области на раздвоенных концах Y-конфигурации до C-концевой области в нижней части каждой цепи.

- Как легкая, так и тяжелая цепь делятся на области, обладающие структурной и функциональной гомологией. Термины «константный» и «вариабельный» используются
- 15 с функциональной точки зрения. В связи с этим следует принимать во внимание, что вариабельные домены фрагментов как легкой (VK) и тяжелой (VH) цепи определяют распознавание антигена и специфичность. И наоборот, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают антителу важных биологические свойства, например, секрецию, способность проходить через плацентарный барьер,
- 20 связывание с Fc-рецептором, связывание с комплементом и т.п. Согласно принятой нумерации, номера доменов константной области увеличиваются по мере того, как они становятся более дистальными от антигенсвязывающего сайта или N-концевой области антитела. N-концевой фрагмент представляет собой вариабельную область, а C-концевой фрагмент представляет собой константную область; CH3- и СК-домены
- 25 фактически составляют C-конец тяжелой и легкой цепи, соответственно.

- Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу специфически распознавать и специфически связывать эпитопы антигенов. Т.е. VK-домен и VH-домен или набор областей, определяющих комплементарность (CDR) антитела, объединяют с образованием вариабельной области, которая задает трехмерный антигенсвязывающий
- 30 сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y-образной структуры. Конкретнее, антигенсвязывающий сайт задают три CDR на каждой из VH- и VK-цепи (т.е. CDR-H1,

CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например, в некоторых молекулах иммуноглобулинов, полученных из видов семейства верблюдовых или сконструированных на основе иммуноглобулинов верблюдовых, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей и не
5 содержать легких цепей. См., например, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

В природных антителах шесть «областей (участков), определяющих комплементарность» или «CDR», присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот,
10 специфически расположенные с образованием антигенсвязывающего домена антитела, поскольку антитело предусматривает образование трехмерной конфигурации в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые «каркасными» областями, демонстрируют меньшую межмолекулярную изменчивость. Каркасные области большей частью принимают конформацию β -листа, а CDR образуют
15 петли, которые соединяются с β -листом и в некоторых случаях входят в состав его структуры. Таким образом, каркасные области действуют как каркас, обеспечивающий размещение CDR в нужной ориентации путем нековалентного взаимодействия между цепями. Антигенсвязывающий домен, образованный размещенными CDR, задает поверхность, комплементарную эпитопу иммунологически реактивного антигена.
20 Комплементарная поверхность стимулирует нековалентное связывание антитела с его эпитопом. Аминокислоты, составляющие CDR и каркасные области, соответственно, легко может выявить специалист в данной области техники для любой заданной вариабельной области тяжелой или легкой цепи, поскольку они точно определены (см. “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health
25 and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

Если существуют два определения термина, используемые и/или принятые в данной области техники, подразумевается, что определение данного термина, используемое в настоящем документе, включает все такие значения, если явно не указано обратное. Конкретным примером является использование термина «область, определяющая
30 комплементарность» («CDR») для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов в пределах вариабельной области полипептидов тяжелых и легких цепей. Данная конкретная область описана в работах Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human

Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) и Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылок. Определения CDR по Kabat и Chothia включают перекрывающиеся при сравнении друг с другом наборы аминокислотных остатков. Тем не менее, 5 подразумевается, что применение любого определения по отношению к CDR антитела или его вариантов находится в рамках указанного термина в соответствии с его определением и использованием в настоящем документе. Соответствующие аминокислотные остатки, составляющие CDR согласно определению по каждой из вышеприведенных ссылок, приведены ниже в таблице для сравнения. Точные номера 10 остатков, составляющих конкретную CDR, меняются в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут в рабочем порядке определить, какие остатки составляют конкретную CDR с учетом аминокислотной последовательности вариабельной области антитела.

Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть получены из организма 15 любых животных, в том числе птиц и млекопитающих. Антитела предпочтительно представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В еще одном варианте реализации вариабельная область может иметь происхождение от хрящевых рыб (например, акул).

В настоящем документе термин «константная область тяжелой цепи» содержит 20 аминокислотные последовательности, происходящие от тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один из: СН1-домена, шарнирного (например, областей верхнего, среднего и/или нижнего шарнира) домена, СН2-домена, СН3-домена или их варианта или фрагмента. Например, антигенсвязывающий полипептид для применения 25 в настоящем изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую СН1-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен, по меньшей мере фрагмент шарнирного домена, и СН2-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен и СН3-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен, по меньшей мере фрагмент шарнирного домена, и СН3-домен, или полипептидную цепь, содержащую СН1-домен, 30 по меньшей мере фрагмент шарнирного домена, СН2-домен и СН3-домен. В еще одном варианте реализации полипептид согласно настоящему изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую СН3-домен. Кроме того, в антителе для применения

в настоящем изобретении может отсутствовать по меньшей мере фрагмент СН2-домена (например, СН2-домен может полностью или частично отсутствовать). Как указано выше, специалист в данной области техники должен понимать, что константную область тяжелой цепи можно модифицировать таким образом, что ее аминокислотная последовательность будет отличаться от природной молекулы иммуноглобулина.

Константная область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, может происходить от различных молекул иммуноглобулинов. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать СН1-домен, происходящий от молекулы IgG₁, и шарнирную область, происходящую от молекулы IgG₃. В еще одном примере константная область тяжелой цепи полипептида может содержать шарнирную область, частично происходящую от молекулы IgG₁, и частично происходящую от молекулы IgG₃. В еще одном примере фрагмент тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, происходящий частично от молекулы IgG₁, и частично от молекулы IgG₄.

В настоящем документе термин «константная область легкой цепи» содержит аминокислотные последовательности, происходящие от легкой цепи антитела. Константная область легкой цепи предпочтительно содержит по меньшей мере один из константного каппа-домена или константного лямбда-домена.

«пара легкая цепь - тяжелая цепь» относится к совокупности легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер за счет дисульфидной связи между СL-доменом легкой цепи и СН1-доменом тяжелой цепи.

Как было указано ранее, субъединичная структура и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В настоящем документе термин «VН-домен» включает N-концевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, а термин «СН1-домен» включает первый (наиболее близкий к N-концу) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. СН1-домен расположен рядом с VН-доменом и со стороны N-конца от шарнирной области тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина.

В настоящем документе термин «СН2-домен» включает фрагмент молекулы тяжелой цепи, который распространяется, например, от приблизительно 244 остатка до 360 остатка антитела согласно общепринятым схемам нумерации (остатки 244-360, система нумерации Kabat; и остатки 231-340, система нумерации ЕС; см. Kabat *et al.*, U.S. Dept.

of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983).
CH2-домен уникален тем, что он не сопряжен с другим доменом непосредственно.
Вместо этого между двумя CH2-доменами интактной нативной молекулы IgG находятся
две N-связанные разветвленные углеводные цепи. Кроме того, хорошо
5 документировано, что CH3-домен распространяется от CH2-домена до С-конца
молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

В настоящем документе термин «шарнирная область» включает фрагмент молекулы
тяжелой цепи, соединяющий CH1-домен с CH2-доменом. Эта шарнирная область
содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-
10 концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо. Шарнирные области
можно разделить на три отдельные домена: верхний, средний и нижний шарнирные
домены (Roux *et al.*, *J. Immunol* 161:4083 (1998)).

В настоящем документе термин «дисульфидная связь» включает ковалентную связь,
образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиоловую
15 группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй
тиоловой группой. В большинстве природных молекул IgG области CH1 и СК
соединены дисульфидной связью, а две тяжелые цепи соединены двумя дисульфидными
связями по положениям, соответствующим 239 и 242 остаткам согласно системе
нумерации Kabat (положениям 226 или 229 согласно системе нумерации EC).

В настоящем документе термин «химерное антитело» означает любое антитело, в
котором иммунореактивная область или сайт получена или происходит от первого вида
животного, а константная область (которая может быть интактной, частичной или
модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена из антитела
другого вида животного. В некоторых вариантах реализации область или сайт
25 связывания мишени имеет нечеловеческое происхождение (например, получен из
организма мыши или примата), а константная область получена из антитела человека.

Слова «специфически связывает» или «обладает специфичностью к» в общем случае
означают, что антитело связывается с эпитопом посредством своего
антигенсвязывающего домена и что указанное связывание предусматривает некоторую
30 комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно
указанному определению, говорят, что антитело «специфически связывается» с

эпитопом, если оно связывается с указанным эпитопом через свой антигенсвязывающий домен легче, чем в случае связывания со случайным, неспецифическим эпитопом. Термин «специфичность» используется в настоящем документе для оценки относительного сродства, с которым определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело «А» обладает более высокой специфичностью к данному эпитопу, чем антитело «В», или можно сказать, что антитело «А» связывается с эпитопом «С» с более высокой специфичностью, чем с родственным эпитопом «D».

В настоящем документе термины «лечить» и «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, причем их целью является предотвращение или замедление (ослабление) нежелательного физиологического изменения или нарушения, например, прогрессирования рака. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, без ограничения, смягчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаружимые, так и необнаружимые. Термин «лечение» также может означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни при отсутствии лечения. Лица, нуждающиеся в лечении, включают лиц, которые уже страдают состоянием или нарушением, а также лиц, склонных к состояниям или нарушениям или лиц, у которых это состояние или нарушение следует предотвратить.

Термин «субъект» или «индивид» или «животное» или «пациент» или «млекопитающее» означает любого субъекта, в частности, субъекта-млекопитающее, для которого диагностика, прогнозирование или терапия являются желательными. Субъекты-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных и животных, содержащихся в зоопарках, используемых в спортивных целях или комнатных животных, например, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, коров и т.д.

В настоящем документе такие фразы, как «пациенту, нуждающемуся в лечении» или «субъект, нуждающийся в лечении» включают субъектов, например, субъектов-млекопитающих, для которых введение антитела или композиции согласно настоящему

изобретению может быть благоприятным, например, для детектирования, диагностической процедуры и/или лечения.

Антитела против IFNAR1

В настоящем изобретении предложены антитела, в том числе биспецифичные антитела и фрагменты, обладающие специфичностью связывания по отношению к белку субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1). Как продемонстрировано на экспериментальных образцах, получено большое количество антител мыши и человека против IFNAR1, обладающих высоким сродством связывания с белком IFNAR1 человека. Два клона антител мыши, 8G11 и 485G10, отобрали для дальнейшей гуманизации и исследования характеристик. Гуманизированные антитела в зависимости от дозы купировали ингибирование пролиферации клеток Daudi, опосредованное ИФН α 2b, противовирусную функцию, индуцированную ИФН α 2b, а также эффективно ингибировали клеточный сигнал, вызванный несколькими ИФН I типа на пМ уровне. ИФН включают ИФН α 1, ИФН α 2a, ИФН α 4, ИФН α 5, ИФН α 6, ИФН α 7, ИФН α 8, ИФН α 10, ИФН α 14, ИФН α 16, ИФН α 17 и ИФН α 21.

Дополнительные функциональные исследования показали, что эти антитела эффективно ингибировали секрецию IP-10 МРК человека, индуцированную ИФН α 2b, и ингибировали ИФН α -зависимое или опосредованное плазмой пациентов с СКВ развитие дендритных клеток, на основании пониженного уровня экспрессии маркеров клеточной поверхности CD38 и CD86 и пониженной продукции ИФН- γ CD4⁺ Т-клетками в системе MLR.

Кроме того, получили различные форматы биспецифичных антител против IFNAR1/BAFF и протестировали их связывающую способность и биологические функции. Эти биспецифичные антитела обладали активностью связывания при блокировании сигнального пути ИФН α 2b, сопоставимой с активностью моноспецифичного антитела 8G11; и улучшенной активностью при блокировании BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток.

В соответствии с одним вариантом реализации настоящего изобретения предложены антитела и их фрагменты, содержащие переменные домены тяжелой цепи и легкой

цепи с CDR-областями антител, описанных в экспериментальных примерах. Сводная информация о CDR приведена ниже в таблице А.

Таблица А. Последовательности CDR

Цепь антитела	Последовательности CDR (CDR1, CDR2, CDR3 по порядку для VH или VL)	SEQ ID NO:
4A6-VH	DYYMH	77
	RIDPDDGETKYAPKFQG	107
	GGNYYVMDN	108
4A6-VL	KASQNVGTNVA	109
	TASYRYS	110
	QQYFSYPHT	111
4B12-VH	DSYMH	112
	RIDPEDGETNYAPKFQG	113
	RVSSLYAMDY	114
4B12-VL	KASQNVGTNVA	109
	LASYRYS	115
	QQYNNYPWT	116
4D8-VH	DYYMH	77
	RIDPEDAETKYAPKFQG	79
	GGNFYVMDY	80
4D8-VL	KASQNVGTNVV	81
	SASYRYS	117
	QQKNSYPYT	118
8G11-VH	DYYMH	77
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	GGNFYVMDY	80
8G11-VL	KASQNVGTNVV	81
	SASYRVS	82
	QQKNNYPYT	83
12G11-VH	DYYMH	77
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	GGNYYAMDY	119
12G11-VL	KASQNVGTNVA	109
	SASYRYS	117
	QQHNSYTYK	120
17F9-VH	DYYIH	92
	RIDPEDGETKYAPKFQD	121
	YDGYGFDY	122
17F9-VL	KASQNVGTNVA	109
	STSYRYS	97
	HQYNNYPYT	123
18B6-VH	DYYMC	124
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	GGNYYAMDY	119
18B6-VL	KASQNVGTNVA	109
	SATYRYS	125
	QQHNSYSYT	126
18C1-VH	DYYMH	77
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	LGNWVFDY	127
18C1-VL	KASQNVGTNVD	128
	SASYRYS	117
	QQYNTYT	129

19B6-VH	DYYMH	77
	RIDPEDGETKYAPKFQV	130
	GGNFYYFDY	131
19B6-VL	KASQNVGTNVA	109
	SASYRYS	117
	QQCINYPYT	132
20B3-VH	DYYIH	92
	RIDPEDGETKYAPTFQG	133
	YNGYSGFDY	134
20B3-VL	KASQNVGTNVV	81
	SASYRYS	117
	QQYNRYPFT	135
20E10-VH	DYYIH	92
	RIDPEDGETKYAPKFQD	121
	YDGYGFDY	122
20E10-VL	KASQNVGTNVA	109
	STSYRYS	97
	HQYNNYPYT	123
20E12-VH	DYYMH	77
	RIDPEDGETKYVPKFQG	136
	GGSYVMDY	137
20E12-VL	KASQNVGTSVA	138
	SASYRYS	117
	QQDNSYPHT	139
21D6-VH	DYYMH	77
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	LHWSLDS	140
21D6-VL	KASQNVGTAVA	141
	STANRDT	142
	QQYSSYPYT	143
24F6-VH	DYYIH	92
	RVDPEDGETKYVPKFLD	144
	GGNYAMDY	119
24F6-VL	KASQNVGTNVA	109
	LASYRYS	115
	QQCNNYRLT	145
29E12-VH	DYYIH	92
	RIDPEDGETKYAPKFQD	121
	YDGYGFDY	122
29E12-VL	KASQNVGTNVA	109
	STSYRYS	97
	HQYNNYPYT	123
30B5-VH	DSYIH	146
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	WLADYSAMDN	147
30B5-VL	KASEDIYNRLA	148
	GATSLET	149
	QQYWNTLYT	150
30C8-VH	DSYMH	112
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	RGSSLYAVDY	151
30C8-VL	KASQNVGTSVA	138
	LASYRHR	152
	QQFNIYPWT	153
34H8-VH	DYYLH	154
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	GGNYDVMDY	155
34H8-VL	KASQNVGTYVV	156

	SASYRYS	117
	QQKNTYPFT	157
36E3-VH	DSYMH	112
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	RGSSLYAVDY	151
36E3-VL	KASQNVGTSVA	138
	LASYRHR	152
	QQFNIYPWT	153
39F5-VH	DYYIH	92
	RIDPEDGETKYAPKFQV	130
	GGNFYYFDY	131
39F5-VL	KASQNVGTNVA	109
	SASYRYS	117
	QQCINYPYT	132
41F1-VH	DYYMH	77
	RIDPEDGETKYVPKFQG	136
	GGNYYVMDY	158
41F1-VL	KASQNVGTYVA	159
	SASYRYN	160
	QQYNNYPLT	161
46A10-VH	DYYMH	77
	RIDPEDGETKYAPKFQV	130
	GGNFYYFDF	162
46A10-VL	KASQNVGTNVA	109
	SASYRYS	117
	QQCINYPYT	132
47C6-VH	DYYIH	92
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	GGNFYYFDY	131
47C6-VL	KASQNVGTNVA	109
	SASYRYS	117
	QQCNSYSYT	163
47F5-VH	DYYMH	77
	RIDPEDGETKYVPKFQG	136
	GGSYVMDY	137
47F5-VL	KASQNVGTSVA	138
	SASYRYS	117
	QQDNSYPHT	139
104A3-VH	DYYIH	92
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	YDGYICFDY	164
104A3-VL	KASQNVGTNVA	109
	STSYRYS	97
	QQYNNYPYT	165
106A7-VH	DYYMH	77
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	DWGHSEFDY	166
106A7-VL	KASQNVGTTVA	167
	SASYRYS	117
	QQYNSYT	168
107E12-VH	DYYIH	92
	RIDPEDGETKYAPKFQD	121
	EGSFTGWFPY	169
107E12-VL	KARQSVGTYVA	170
	STSYRYN	171
	QQYHSYPYT	172
124D12-VH	DYYIH	92
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78

	YDGYCFCFDY	164
124D12-VL	KASQNVGTNVA	109
	STSYRYS	97
	QQYNNYPYT	165
260H8-VH	SDYWN	173
	YISYSGSIYYNPSLKS	174
	SGGMYFFDY	175
260H8-VL	RASGNIHNYLA	176
	NAKTLED	177
	QHFWSIPPT	178
268E9-VH	SDYWN	173
	YISYSGSIYYNPSLKS	174
	SGGMYFFDY	175
268E9-VL	RASGNIHNYLA	176
	NAKTLED	177
	QHFWSIPPT	178
269A7-VH	SDYWN	173
	YISYSGTIYYNPSLKS	179
	SGGMYFFDY	175
269A7-VL	RASGNIHNYLA	176
	NAKTLED	177
	QHFWSIPPT	178
293H10-VH	SDYWN	173
	YISYSGNTDYNPSLKS	180
	SEGMYYFFDY	181
293H10-VL	RASGNIHNYLA	176
	NAKTLAD	182
	QHFWSIPPT	183
370E5-VH	DYYIH	92
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	FGGLTAMDY	184
370E5-VL	KASQNVGTNVA	109
	ATSYRYS	185
	QQYNNYPYT	165
392D6-VH	DYYVH	186
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	FGGLDAMDY	187
392D6-VL	KASQNVGTNVA	109
	STSYRYN	171
	QQFNRYPYT	188
402G3-VH	SHFIH	189
	WIYPGDDDDTEYNHFKFNG	190
	RVEYYNGGFAY	191
402G3-VL	KASKNIRNNLG	192
	SGSTLQS	193
	QQYDQYPLT	194
430H6-VH	TYGMGVG	195
	NIWWDDDKYYNPSLKN	196
	HPLPGYKDNYVVDA	197
430H6-VL	RSSQSLEYSQYTYLE	198
	GVSNRFS	199
	FQATHDPYT	200
485G10-VH	DYYIH	92
	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
	YHGYWALDY	95
485G10-VL	KTSQNVGTNVA	96
	STSYRYS	97
	HQYFSYPYT	98

487E3-VH	DCYIH	201
	RIDPEDGETKYAPKFQA	202
	HCNFLYFDY	203
487E3-VL	KASQNVGTIVA	204
	SASYRSS	205
	QQYNNYPVI	206

В некоторых вариантах реализации VH CDR1, CDR2 и CDR3 выбраны из любого набора VH CDR1, CDR2 и CDR3, показанных в таблице A, и VL CDR1, CDR2 и CDR3 выбраны из любого набора VL CDR1, CDR2 и CDR3, показанных в таблице A. В некоторых вариантах реализации VH CDR1, CDR2 и CDR3 и VL CDR1, CDR2 и CDR3 выбраны из областей, происходящих от одного и того же антитела, описанного в примерах.

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна или две или три или четыре или пять или шесть из VH CDR1, CDR2 и CDR3 и VL CDR1, CDR2 и CDR3 из вышеописанных последовательностей модифицированы посредством одного, двух или трех добавлений, делеций, замен аминокислот или их комбинаций.

В одном варианте реализации антитело против IFNAR1 или его фрагмент содержат следующие CDR: HCDR1: DYIMH (SEQ ID NO: 77), HCDR2: RIDPEDGETKYAPKFQGG (SEQ ID NO: 78), HCDR3: GGNFYVMDY (SEQ ID NO: 80), LCDR1: KASQNVGTNVV (SEQ ID NO: 81), LCDR2: SASYRVS (SEQ ID NO: 82) и LCDR3: QQKNNYPYT (SEQ ID NO: 83).

В одном варианте реализации один или более из аминокислотных остатков в CDR замещены другой аминокислотой во избежание посттрансляционных модификаций. Пример антитела против IFNAR1 или его фрагмента содержит следующие CDR: HCDR1: DYIMH (SEQ ID NO: 77), HCDR2: RIDPEDAETKYAPKFQGG (SEQ ID NO: 79), HCDR3: GGNFYVMDY (SEQ ID NO: 80), LCDR1: KASQNVGTNVV (SEQ ID NO: 81), LCDR2: SASYRVS (SEQ ID NO: 82) и LCDR3: QQKNNYPYT (SEQ ID NO: 83).

В некоторых вариантах реализации антитело гуманизировано, однако содержит одну или более из следующих обратных мутаций в тяжелой цепи: 12V, 20L, 24G, 38K, 48I, 68A, 70I, 72A, 79A и 81L согласно нумерации по Kabat и их комбинаций. В некоторых вариантах реализации антитело гуманизировано, однако содержит одну или более из следующих обратных мутаций в легкой цепи: 4M, 13T, 21V, 43S, 46V, 74I, 78V и 87F согласно нумерации по Kabat и их комбинаций.

Неограничивающие примеры вариабельной области тяжелой цепи включают SEQ ID NO: 7 и 84-87. Неограничивающие примеры вариабельной области легкой цепи включают SEQ ID NO: 8 и 88-91.

5 В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:85. В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:88.

В одном варианте реализации антитело против IFNAR1 или его фрагмент содержат следующие CDR: HCDR1: DYYIH (SEQ ID NO: 92), HCDR2: RIDPEDGETKYAPKFQG (SEQ ID NO: 93), HCDR3: YHGYWALDY (SEQ ID NO: 95), LCDR1: KTSQNVGTNVA (SEQ ID NO: 96), LCDR2: STSYRYS (SEQ ID NO: 97) и LCDR3: HQYFSYPYT (SEQ ID NO: C6).

В одном варианте реализации антитело против IFNAR1 или его фрагмент содержат следующие CDR: HCDR1: DYYIH (SEQ ID NO: 92), HCDR2: RIDPEDAETKYAPKFQG (SEQ ID NO:94), HCDR3: YHGYWALDY (SEQ ID NO: 95), LCDR1: KTSQNVGTNVA (SEQ ID NO: 96), LCDR2: STSYRYS (SEQ ID NO: 97) и LCDR3: HQYFSYPYT (SEQ ID NO: C6).

В некоторых вариантах реализации антитело гуманизировано, однако содержит одну или более из следующих обратных мутаций в тяжелой цепи: 20L, 24G, 38K, 48I, 68A, 70I, 72A, 81L и 97G согласно нумерации по Kabat и их комбинаций. В некоторых вариантах реализации антитело гуманизировано, однако содержит одну или более из следующих обратных мутаций в легкой цепи: 13T, 21V, 36Y, 46P, 78V и 104L согласно нумерации по Kabat и их комбинаций.

Неограничивающие примеры вариабельной области тяжелой цепи включают SEQ ID NO: 73 и 99-102. Неограничивающие примеры вариабельной области легкой цепи включают SEQ ID NO: 74 и 103-106.

В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:100. В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO:105.

Интересным открытием явилось то, что мишенью антител, полученных в настоящем изобретении, является эпитоп, отличающийся от эпитопа известного антитела против IFNAR1 - анифролумаба. Соответственно, в одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью к белку субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1), причем указанное антитело или его фрагмент могут связываться с одним или более из аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из H273, L274, Y275, K276 и K278 белка IFNAR1.

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент могут связываться с по меньшей мере двумя из этих остатков в составе эпитопа, например, H273 и L274, H273 и Y275, H273 и K276, H273 и K278, L274 и Y275, L274 и K276, L274 и K278, Y275 и K276, Y275 и K278 или K276 и K278.

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент могут связываться с по меньшей мере двумя из этих остатков в составе эпитопа, например, H273, L274 и Y275; H273, L274 и K276; H273, L274 и K278; H273, Y275 и K276; H273, Y275 и K278; H273, K276 и K278; L274, Y275 и K276; L274, Y275 и K278; L274, K276 и K278; и Y275, K276 и K278.

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент могут связываться с по меньшей мере четырьмя из этих остатков в составе эпитопа, например, L274, Y275, K276 и K278; H273, Y275, K276 и K278; H273, L274, K276 и K278; H273, L274, Y275 и K278; и H273, L274, Y275 и K276.

В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент может связываться со всеми указанными остатками в составе эпитопа.

CDR, переменные области тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи согласно настоящему изобретению можно дополнительно модифицировать. В некоторых вариантах реализации модифицированные переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи сохраняют по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности и по-прежнему способны связываться с IFNAR1.

В некоторых вариантах реализации модификация представляет собой замену в не более чем одном положении горячей точки в каждом из CDR. В некоторых вариантах

реализации модификация представляет собой замену в одном, двух или трех таких положениях горячей точки. В одном варианте реализации модификация представляет собой замену в одном из положений горячей точки. В некоторых вариантах реализации такие замены являются консервативными заменами.

- 5 “Консервативная аминокислотная замена» является заменой, при которой аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, содержащим аналогичную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, содержащих сходные боковые цепи, в том числе основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи
10 (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например,
15 тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Так, аминокислотный остаток, не являющийся незаменимой аминокислотой, в составе полипептида иммуноглобулина предпочтительно замещают другим аминокислотным остатком из того же семейства боковой цепи. В еще одном варианте реализации цепь аминокислот можно заменить структурно аналогичной цепью, отличающейся порядком и/или составом членов
20 семейства боковой цепи.

Неограничивающие примеры консервативных аминокислотных замен приведены ниже в таблице, где балльный показатель сходства, равный 0 или выше, указывает на консервативную замену между двумя аминокислотами.

Матрица сходства аминокислот

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

Консервативные аминокислотные замены

Для аминокислоты	Замена
Аланин	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Аргинин	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Аспарагин	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Глутамин	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая кислота	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Изолейцин	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Лизин	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Метионин	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Пролин	D-Pro
Серин	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys

Треонин	D-Thr, Ser, D-Ser, алло-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Тирозин	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Валин	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Кроме того, специалист в данной области техники должен понимать, что антитела, описанные в настоящем документе, можно модифицировать таким образом, что их аминокислотная последовательность будет отличаться от природного связывающего полипептида, из которого они получены. Например, полипептид или аминокислотная последовательность, происходящие от указанного белка, могут быть сходны, например, могут обладать определенной процентной идентичностью по отношению к исходной последовательности, например, могут быть на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичны исходной последовательности.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит аминокислотную последовательность или одну или более групп, в норме не ассоциированных с антителом. Типичные модификации подробно описаны ниже. Например, антитело согласно настоящему изобретению может содержать последовательность гибкого линкера или может быть модифицировано путем добавления функциональной группы (например, ПЭГ, лекарственного вещества, токсина или метки).

Антитела, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают производные, модифицированные, например, путем ковалентного присоединения к антителу молекулы любого типа, так что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с эпитопом. В качестве примера (но не в целях ограничения), антитела можно модифицировать, например, путем гликозилирования, ацетилирования, ПЭГилирования, фосфорилирования, амидирования, модификации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, присоединения к клеточному лиганду или другому белку и т.д. Любую из многочисленных химических модификаций можно выполнить с помощью известных методик, включая специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д., но не ограничиваясь ими. Кроме того, антитела могут содержать одну или более из неклассических аминокислот.

В некоторых вариантах реализации антитела можно конъюгировать с терапевтическими агентами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими агентами или ПЭГ.

Антитела можно конъюгировать или объединять с терапевтическим агентом, который может включать обнаруживаемые метки, например, радиоактивные метки, иммуномодулятор, гормон, фермент, олигонуклеотид, фотоактивный терапевтический или диагностический агент, цитотоксический агент, который может представлять собой лекарственное вещество или токсин, контрастирующий агент для УЗИ, нерадиоактивную метку, их комбинацию и другие подобные агенты, известные в данной области техники.

Бифункциональные молекулы

Предполагается, что связывание как IFNAR1, так и другого белка, вовлеченного в иммунную систему, должно быть полезным или даже синергичным. Соответственно, в некоторых вариантах реализации предложены бифункциональные молекулы, например, биспецифичное антитело, содержащее фрагмент антитела против IFNAR1, описанного в настоящем документе, и еще один антигенсвязывающий фрагмент.

Второй фрагмент бифункциональной молекулы может представлять собой любой из следующих фрагментов, (1) фрагмент, мишенью которого являются В-клетки, в том числе фактор роста и выживания В-клеток, например, фрагмент антитела против BAFF, TACI-Ig; фрагмент, мишенью которого являются молекулы поверхности В-клеток, например, фрагменты антител против CD20 и CD22; (2) фрагмент, мишенью которого являются костимулирующие молекулы, например, CTLA4-Ig и фрагмент антитела против CTLA4; (3) фрагмент, мишенью которого являются Т-клетки, например, эдратид (hCDR1); и (4) фрагмент, мишенью которого являются цитокины и факторы комплемента, например, фрагменты антител против ИЛ-6, CXCL13 и C5.

В частности, предполагается, что пути IFNAR1 и BAFF (фактора, активирующего В-клетки) могут оказывать синергическое действие при лечении аутоиммунных заболеваний и нарушений, например, волчанки. Протестировали способность к связыванию и биологические функции биспецифичных антител против IFNAR1/BAFF различных форматов (изображенные на фиг. 7). Неожиданно выяснилось, что эти

биспецифичные антитела обладали активностью связывания при блокировании сигнального пути ИФН α 2b, сопоставимой с активностью моноспецифичного антитела 8G11; и улучшенной активностью при блокировании BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток.

- 5 Таким образом, в одном варианте реализации предложена бифункциональная молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к белку субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1), и второй антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к белку фактора, активирующего В-клетки человека. Фрагмент антитела против IFNAR1 может
- 10 представлять собой фрагмент согласно любому варианту реализации настоящего изобретения. Фрагмент антитела против BAFF может представлять собой фрагмент белимумаба (см., например, Dubey AK, et al., *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*. 2011;2(4):317-319).

- Бифункциональная молекула может находиться в формате, изображенном на фиг. 7, т.е.
- 15 содержащем полноценное антитело, слитое с двумя одноцепочечными фрагментами (scFv) или двумя Fab-фрагментами. Кроме того, предложены бифункциональные или биспецифичные молекулы других форматов. В некоторых вариантах реализации каждый из фрагментов против IFNAR1 и против BAFF независимо выбраны из Fab-фрагмента, одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) или однодоменного
- 20 антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифическое антитело дополнительно содержит фрагмент Fc.

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител

- В настоящем изобретении также предложены выделенные полинуклеотиды или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела, их варианты и производные
- 25 согласно настоящему изобретению. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать целые переменные области тяжелой и легкой цепи антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов и производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов. Кроме того, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать фрагменты
- 30 переменных областей тяжелой и легкой цепи антигенсвязывающих полипептидов, их

вариантов и производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов.

Способы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации как переменные, так и константные области антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению имеют полностью человеческое происхождение. Полностью человеческие антитела можно получить, используя методики, описанные в данной области техники и в настоящем документе. Например, полностью человеческие антитела против специфического антигена можно получить путем введения антигена в организм трансгенного животного, модифицированного с целью продукции таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, причем эндогенные локусы указанного животного отключены. Типичные методики, которые можно применять для получения таких антител описаны в патентах США 6150584; 6458592; 6420140, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылок.

Способы лечения и диагностики

Антитела, варианты или производные согласно настоящему изобретению, описанные в настоящем документе, можно применять в различных способах лечения и диагностики.

Настоящее изобретение дополнительно относится к терапевтическим способам на основе антител, включающим введение антител согласно настоящему изобретению пациенту, например, животному, млекопитающему и человеку для лечения одного или более из нарушений или состояний, описанных в настоящем документе. Терапевтические соединения согласно настоящему изобретению включают антитела согласно настоящему изобретению (включая их варианты и производные, описанные в настоящем документе) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению (включая их варианты и производные, описанные в настоящем документе), но не ограничиваются ими.

В одном варианте реализации предложен способ подавления иммунного ответа у пациента, нуждающегося в этом. Этот способ предусматривает введение пациенту антитела, фрагмента или бифункциональной молекулы согласно настоящему

изобретению. В некоторых вариантах реализации пациент представляет собой реципиента трансплантата ткани или органа.

В некоторых вариантах реализации предложен способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения. Неограничивающие примеры аутоиммунного заболевания или нарушения включают диабет 1 типа, ревматоидный артрит (РА), псориаз/псориатический артрит, рассеянный склероз, системную красную волчанку (волчанку), воспалительное заболевание кишечника, болезнь Аддисона, болезнь Грейвса, синдром Шёгрена, тиреоидит Хашимото, миастению гравис, васкулит, злокачественную анемию и целиакию.

В конкретных вариантах реализации указанный способ можно применять для лечения системной красной волчанки (волчанки).

Конкретная дозировка и схема лечения любого конкретного пациента зависит от различных факторов, в том числе конкретных используемых антител, их вариантов и производных, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и питания пациента, а также времени введения, скорости выведения, комбинации лекарственных средств и тяжести конкретного заболевания, подвергаемого лечению. Экспертная оценка таких факторов медицинскими работниками входит в обычные навыки специалиста в данной области техники. Количество также зависит от индивидуальных особенностей пациента, подвергаемого лечению, пути введения, типа состава, характеристик используемого соединения, тяжести заболевания и желательного эффекта. Используемое количество можно определить с помощью фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

Способы введения антител, их вариантов включают интрадермальное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное, подкожное, интраназальное, эпидуральное и пероральное введение, но не ограничиваются ими. Антигенсвязывающие полипептиды или их композиции можно вводить любым удобным путем, например, путем вливания или болюсной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую полости рта, слизистую заднего прохода или кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Таким образом, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему

изобретению, можно вводить перорально, ректально, парентерально, интрацистернально, интравагинально, внутривнутрибрюшинно, наружно (в виде порошков, мазей, капель или трансдермального пластыря), буккально или в виде перорального или назального аэрозоля.

- 5 Термин «парентеральный» в настоящем документе относится к режимам введения, включающим внутривенную, внутримышечную, внутривнутрибрюшинную, внутривнутригрудинную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и вливание.

Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение антител согласно настоящему изобретению в центральную нервную систему
10 любым подходящим путем, включая внутривнутрижелудочковую или интратекальную инъекцию; внутривнутрижелудочковую инъекцию можно облегчить с помощью внутривнутрижелудочкового катетера, например, присоединенного к резервуару, например, резервуару Оммайя. Кроме того, можно использовать пульмональное введение, например, с помощью ингалятора или распылителя и состава с агентом,
15 способствующим образованию аэрозоля.

Может быть желательным местное введение антигенсвязывающих полипептидов или композиций согласно настоящему изобретению в область, нуждающуюся в лечении; этого можно достичь, например (но не в целях ограничения), путем местного вливания во время хирургической операции, наружного нанесения, например, в сочетании с
20 раневой повязкой после хирургической операции, путем инъекции, посредством катетера, суппозитория или имплантата, причем указанный имплантат представляет собой пористый, непористый или желеобразный материал, в том числе мембраны, например, с силиконовыми мембранами или волокна. При введении белка, в том числе антитела согласно настоящему изобретению, предпочтительно следует уделять
25 внимание использованию материалов, не поглощающих белок.

Кроме того, предложены способы детектирования экспрессии белка субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1) в образце, в некоторых вариантах реализации включающие приведение образца в контакт с антителом или его фрагментом и детектирование связывания, которое указывает на экспрессию IFNAR1 в
30 образце.

Композиции

В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции. Такая композиция содержит эффективное количество антитела и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно
5 содержит второй противораковый агент (например, ингибитор ключевого компонента иммунного ответа).

В конкретном варианте реализации термин «фармацевтически приемлемый» обозначает одобренный нормативно-правовым агентством федерального правительства или правительства штата или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной
10 фармакопее для применения у животных и, конкретнее, у человека. Кроме того, «фармацевтически приемлемый носитель» в общем случае представляет собой нетоксичный твердый, полужидкий или жидкий наполнитель, разбавитель, материал для инкапсуляции или вспомогательный состав любого типа.

Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу
15 или среде-носителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, например, воду и масла, включая масла нефти, растительного, животного или синтетического происхождения, например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном
20 введении фармацевтической композиции. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид
25 натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. При необходимости композиция также может содержать небольшие количества увлажнителей или эмульгаторов или pH-буферных агентов, например, ацетатов, цитратов или фосфатов. Кроме того, предусмотрено применение антибактериальных агентов, например, бензилового спирта или метилпарабенов; антиоксидантов, например,
30 аскорбиновой кислоты или бисульфита натрия; хелатообразующие агенты, например, этилендиаминтетрауксусную кислоту; и агенты для регулировки тоничности, например, хлорид натрия или декстрозу. Эти композиции могут иметь вид растворов, суспензий,

- эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Композицию можно составить в виде суппозитория с использованием традиционных связующих веществ и носителей, например, триглицеридов. Составы для перорального применения могут содержать стандартные носители, например, маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин-натрий, целлюлозу, карбонат магния и т.д. фармацевтической степени чистоты. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны E. W. Martin в Remington's Pharmaceutical Sciences, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Такая композиция может содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя для получения формы для надлежащего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения. Исходный препарат можно поместить в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для многократного приема из стекла или пластика.
- В одном варианте реализации композицию составляют в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, приспособленной для внутривенного введения людям. Обычно композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция также может содержать солюбилизующий агент и местный анестетик, например, лигнокаин, для ослабления боли в области инъекции. В общем случае ингредиенты вводят отдельно или в смеси друг с другом в составе лекарственной формы, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметичном контейнере, например, ампуле или саше с указанием количества активного агента. Если композиция предназначена для введения посредством вливания, ее можно разлить в бутылку для вливания, содержащую стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. Если композицию вводят посредством инъекции, можно предоставить ампулу со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором для смешивания ингредиентов перед введением.
- Соединения согласно настоящему изобретению можно составить в нейтральной форме или форме соли. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные анионами, например, соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и

соли, образованные катионами, например, гидроксидами натрия, калия, аммония, кальция, железа (III), изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламинэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

ПРИМЕРЫ

5 **Пример 1. Получение моноклональных антител мыши против IFNAR-1 человека**

В данном примере показано получение моноклональных антител мыши против IFNAR-1 человека с использованием гибридной технологии.

Иммунизация

Рекомбинантные белки IFNAR-1 человека, содержащие полную внеклеточную область IFNAR-1 человека, использовали в качестве иммуногена для получения антител против IFNAR-1 человека. Мышей C57BL/6, Balb/c, SJL или крыс SD вначале подкожно (п/к) иммунизировали 50 μ г иммуногена, а затем внутривентрально (в/б) или п/к иммунизировали раз в две недели 25 μ г иммуногена. Иммунный ответ отслеживали по ретроорбитальному кровотечению. Выполняли скрининг плазмы посредством твердофазного ИФА связывания. Вкратце, IFNAR-1 с маркером His иммобилизовали в количестве 0,5 μ г/мл в течение ночи, а затем блокировали 5% БСА в PBS. Последовательно разбавленные сыворотки инкубировали с иммобилизованным антигеном в течение 1 ч при комнатной температуре. Полученные планшеты промывали PBS/T и инкубировали с антителом козы-PIX против IgG мыши в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты проявляли с субстратом TMB и анализировали на спектрофотометре при OD 450–630 нм. Мышей с высокими титрами иммуноглобулинов против IFNAR1 отбирали для слияния и дальнейшего скрининга. За три дня до умерщвления и удаления селезенки мышей подвергали последней повторной в/б иммунизации с использованием 25 μ г антигена. Селезенки использовали для слияния клеток.

Слияние клеток и скрининг гибридом

Спленоциты мыши, выделенные из организмов мышей, сливали с клетками миеломной линии мыши на основании стандартных протоколов. Суспензии одиночных лимфоцитов селезенки иммунизированных мышей сливали с одной третью от количества

несекретирующих миеломных клеток мыши SP2/0 на аппарате для электрослияния. Клетки высевали из расчета приблизительно 1×10^5 /лунку в плоскодонный титрационный микропланшет, а затем инкубировали в течение приблизительно 10 дней в селективной среде, содержащей 1*НАТ, 10% эмбриональной телячьей сыворотки в DMEM. Через 10 дней клетки культивировали в среде с заменой НАТ на НТ. Отдельные лунки подвергали скринингу посредством твердофазного ИФА на предмет моноклональных IgG-антител мыши против IFNAR-1. Для гибридом, секретрирующих антитела, меняли среду и выполняли повторный скрининг через 2 дня. Если гибридомы по-прежнему были положительны в отношении антител мыши против IFNAR-1, их дважды субклонировали путем ограничивающего разбавления. Затем стабильные субклоны культивировали *in vitro*, получая небольшое количество антитела в среде тканевой культуры для дальнейшей оценки его характеристик посредством различных функциональных анализов.

Клоны, демонстрировавшие выраженную блокирующую активность в анализе репортера, реагирующего на ИФН, отбирали для субклонирования. Супернатанты 2-циклового субклона использовали для подтверждения связывания IFNAR-1 человека и макака-резуса на основе твердофазного ИФА и блокирующей активности по отношению к ИФН-альфа с последующим секвенированием и дальнейшим анализом. После этого скрининга отобрали 38 клонов (4A6, 4B12, 4D8, 8G11, 12G11, 17F9, 18B6, 18C1, 19B6, 20B3, 20E10, 20E12, 21D6, 24F6, 29E12, 30B5, 30C8, 34H8, 36E3, 39F5, 41F1, 46A10, 47C6, 47F5, 104A3, 106A7, 107E12, 124D12, 260H8, 268E9, 269A7, 293H10, 370E5, 392D6, 402G3, 430H6, 485G10 и 487E3). Последовательности этих клонов перечислены в таблице 1. Химерные антитела этих гибридом, слитые с Fc IgG1 человека, получали для дальнейшего исследования характеристик.

Таблица 1. Последовательности антител, отобранных при скрининге

Цепь антитела	Последовательности* (CDR выделены подчеркиванием и полужирным шрифтом)	SEQ ID NO:
4A6-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DYYMH</u> WVKQRTEQGLEWIG <u>R</u>	1

	<u>IDPDDGETKYAPKFQ</u>GKATMTADTSSNTAYLQLGS LTSEDAAVYYCARG<u>G</u> <u>NYVMDN</u>WGQGTSVTVSS	
4A6-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKSGQSPKALIY<u>T</u> <u>ASYRYS</u>GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNLQSEDLADYL <u>CQOYFSYPHT</u>FGG GTKLEIK	2
4B12-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK<u>DSYMH</u> WVKERTEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDGETNYAPKFQ</u>GKATLTADTSSNTAYLQLSG LTSEDTAVYYCARR<u>V</u> <u>SSLYAMDY</u>WGQGTSVTVSS	3
4B12-VL	DIVMTQSQKSMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKPLIY<u>L</u> <u>ASYRYS</u>GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF <u>CQOYNNYPWT</u>FGG GTKLEIK	4
4D8-VH	EVRLQQSGAELVQPGASVKLSCTGFGFNK<u>DYYMH</u> WVKQRTEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDAETKYAPKFQ</u>QATITADTSSNTAYVQVSSL SSEDTAVYYCARG<u>G</u> <u>NFYVMDY</u>WGQGTSVTVSS	5

4D8-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVV</u> WYQQKPGQSPKVLII<u>S</u> <u>ASYRYS</u>GVDPDRFTGSGSGTDFTLIISNVQSEDLAEYF C<u>QOKNSYPYTF</u>GG GTKLEIK	6
8G11-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGFGFNIK<u>DYYMH</u> WVKQRAEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQ</u>GKATITADTSSNTAYLQVSSL TSEDTAVYYC<u>ARGG</u> <u>NFYVMDY</u>WGQGTSTVTVSS	7
8G11-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVV</u> WYQQKPGQSPKVLII<u>S</u> <u>ASYRV</u>SGVPDRFTGSGSGTDFTLIISNVQSEDLAEYF C<u>QOKNNYPYTF</u>GG GTKLEIK	8
12G11-VH	AVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK<u>DYYMH</u> WVKQRTEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQ</u>GKATITADTSSNTAYLQLSSL TSEDTAVYYC<u>ARGG</u> <u>NYYAMDY</u>WGQGTSTVTVSS	9
12G11-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKALII<u>S</u> <u>ASYRYS</u>GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF C<u>QOHNSYTYK</u>FGG	10

	GTKVEIK	
17F9-VH	EVQLQSWADLVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DYYIH</u> WVKQRTEQGLEWIG <u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQD</u> KAAITADTSSNTAYLQLSSL TSEGTAVYYCARY <u>D</u> <u>GYYGFDY</u> WGQGTTTLTVSS	11
17F9-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKPLI <u>S</u> <u>TSYRYS</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLAEYF <u>CHQYNNYPYTFGG</u> GTKLEIK	12
18B6-VH	EVQLQQSGAKLVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DYYMC</u> WVKQRTEQGLEWIG <u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQG</u> KATITADTSSNTASLQLSSL TSEDTAVYYCARG <u>G</u> <u>NYYAMDY</u> WGQGSVTVSS	13
18B6-VL	DTVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKALI <u>S</u> <u>ATYRYS</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF <u>CQQHNSYSYTFGG</u> GTKLEIK	14
18C1-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DYYMH</u> WVKQRTEQGLEWIG <u>R</u>	15

	<u>IDPEDGETKYAPKFQ</u>GKATITADTSSNTAYLQLSSL TSED TAVYYCAR<u>L</u>G <u>NWVFDY</u>WGQGTTLTVSS	
18C1-VL	DTVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVD</u> WYQQKSGQSPKALI<u>S</u> <u>ASYRYS</u>GV PDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF <u>CQQYNTYT</u>FGGGT KLEIK	16
19B6-VH	EVQLQQFGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK<u>DYYMH</u> WVKQRTEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQ</u>VKATITADTSSNTAYLHFSSL TSED TAVYYCVR<u>G</u>G <u>NFYFDY</u>WGQGTTLTVSS	17
19B6-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKALI<u>S</u> <u>ASYRYS</u>GV PDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF <u>CQQCINYPY</u>TFGG GTKLEIK	18
20B3-VH	EVHLQQSGAELVKPGTSLKLSCTASGFNIK<u>DYYIHW</u> VKQRTEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPTFOG</u>KATITADTSSNTAYLQLSSL TSED TAVYYCARY<u>N</u> <u>GYSGFDY</u>WGQGTTLTVSS	19

20B3-VL	DIVMTQSQKFMSTSEGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVV</u> WYQQKPGQSPKALI<u>S</u> <u>ASYRYS</u>GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF C<u>QOYNRYPFT</u>FGA GTKLELK	20
20E10-VH	EVQLQSWADLVKPGASVKLSCTASGFNIK<u>DYYIH</u> WVKQRTEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQD</u>KAAITADTSSNTAYLQLSSL TSEGTAVYYCARY<u>D</u> <u>GYYGFDY</u>WGQGTTLTVSS	21
20E10-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKPLI<u>S</u> <u>TSYRYS</u>GVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLAEYF C<u>HOYNNYPYT</u>FGG GTKLEIK	22
20E12-VH	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCTASGFNIK<u>DYYMH</u> WVKQRTEQGLECIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYVPKFQG</u>KATITAETSSNTAYLQLSSL TAEDTAVYYCSR<u>GG</u> <u>SYVMDY</u>WGQGTSTVTVSS	23
20E12-VL	DVVMTQSRKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTSVA</u> WYQQKLGQSPKALI<u>S</u> <u>ASYRYS</u>GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF C<u>QODNSYPHT</u>FGG	24

	GTKLEIK	
21D6-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DYYMH</u> WVKQRTEQGLEWIG <u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQG</u> KATITADTSSNTAYLQLSSL TSEDTAVYYCT <u>SLH</u> <u>WSLDS</u> WGQGTTTLTVSS	25
21D6-VL	DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITC <u>KASQNVGTAVAW</u> YQQQPGQSPKPLI <u>YS</u> <u>TANRDT</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLAHY FC <u>QQYSSYPYTF</u> GG GTKLEIK	26
24F6-VH	DVQLQQSGAELVKPGASVNLSTGSGFNIK <u>DYYIH</u> WVKQRTEQGLEWIG <u>R</u> <u>VDPEDGETKYVPKFLLD</u> KATITADTSSNTAYLQLSSL TSEDTAVYYCTR <u>GG</u> <u>NYYAMDY</u> WGQGSVTVSS	27
24F6-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKSGQSPKALIF <u>L</u> <u>ASYRYS</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF C <u>QQC</u> NNYRLT <u>FGS</u> GTKLEIK	28
29E12-VH	EVQLQSWADLVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DYYIH</u> WVKQRTEQGLEWIG <u>R</u>	29

	<u>IDPEDGETKYAPKFQD</u>KAAITADTSSNTAYLQLSSL TSEGTAVYYCARY<u>D</u> <u>GYYGFDY</u>WGQGTTLVSS	
29E12-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKPLI<u>S</u> <u>TSYRYS</u>GVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLAEYF <u>CHQYNNYPYT</u>FGG GTKLEIK	30
30B5-VH	EAQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIR<u>DSYIHW</u> VNQRTEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQG</u>KATMTADTSSNTAYLQLSSL LTSEDTAVYYCAS<u>WL</u> <u>ADYSAMDN</u>WGQGTSTVTVSS	31
30B5-VL	DIQMTQSSSSFSVSLGDRVITITC<u>KASEDIYNRLAWY</u> QQKPGNAPRLLIS<u>G</u> <u>ATSLET</u>GVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYY <u>CQQYWNTLYT</u>FGG GTKLEMK	32
30C8-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTSSGFNIK<u>DSYMH</u> WVKQRTEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQG</u>KATITADTSSNTAYLQLNSL TSEDTAVYYCARR<u>G</u> <u>SSLYAVDY</u>WGQGTSTVTVSS	33

30C8-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTSVA</u> WYQQKPGQSPKAVIYL <u>ASYRHR</u>GVPARFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEY FC<u>QQFNIYPWT</u>FGG GTKLEIK	34
34H8-VH	EVQLLQSGAELVKPGASVRLSCTASGFNIK<u>DYYLH</u> WVKQRTEQGLEWIGR <u>IDPEDGETKYAPKFQG</u>KATITDTSSNTAYLQLSSL TSEDTAVYYCTR<u>GG</u> <u>NYDVMDY</u>WGQGTSVTVSS	35
34H8-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTYVV</u> WYQQKPGQSPKALIYS <u>ASYRYS</u>GVDPDRFTGSGSGTDFTLTIGNVQSEDLAEYF C<u>QOKNTYPFT</u>FGG GTKLEIE	36
36E3-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTSSGFNIK<u>DSYMH</u> WVKQRTEQGLEWIGR <u>IDPEDGETKYAPKFQG</u>KATITADTSSNTAYLQLNSL TSEDTAVYYCARR<u>G</u> <u>SSLYAVDY</u>WGQGTSVTVSS	37
36E3-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTSVA</u> WYQQKPGQSPKAVIYL <u>ASYRHR</u>GVPARFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEY FC<u>QQFNIYPWT</u>FGG	38

	GTKLEIK	
39F5-VH	EVQLQQSGADLVRPGASVKLSCTASGFNIK <u>DYYIHW</u> VKQRTEQGLEWIG <u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQV</u> KTTITADTSSNTAYLQFSSL TSED AVYYCVR <u>GG</u> <u>NFY YFDY</u> WGQGSTLTVSS	39
39F5-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKALI <u>S</u> <u>ASYRYS</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF C <u>QQCINYPYTF</u> GG GTKLEIK	40
41F1-VH	EVQLQQSGAELVKSGASVRLSCTASGFNIK <u>DYYMH</u> WVKQRTEKGLEWIG <u>R</u> <u>IDPEDGETKYV PKFQG</u> KATITADTSSNTVYLQLNSL TSED AVYYCVR <u>GG</u> <u>NYYVMDY</u> WGQGSTVTVSS	41
41F1-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGTYVA</u> WYQQKPGQSPKVVI <u>S</u> <u>ASYRYN</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQPEDLA EYF C <u>QQYNNYPLT</u> FGS GTKLEIK	42
46A10-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DYYMH</u> WVKQRTEQGLELIG <u>R</u>	43

	<u>IDPEDGETKYAPKFQV</u>KATITADASSNTAYLQFSSL TSEDAAVYYCVR<u>GG</u> <u>NFYFDF</u>WGQGTTLTVSS	
46A10-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKALVY<u>S</u> <u>ASYRYS</u>GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISDVQSEDLAEYF <u>CQQCINYPYT</u>FGG GTKLEIK	44
47C6-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK<u>DYYIHW</u> VKQRTEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQG</u>KATITADTSSNTAYLHLSSL TSEDTAVYYCSR<u>GG</u> <u>NFYFDDY</u>WGQGTSLTVSS	45
47C6-VL	DIVMTQSQKFMSTLVGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKALIY<u>S</u> <u>ASYRYS</u>GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF <u>CQQCNSYSYT</u>FGG GTKLEIK	46
47F5-VH	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCTASGFNIK<u>DYYMH</u> WVKQRTEQGLECIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYVPKFQG</u>KATITAETSSNTAYLQLSSL TAEDTAVYYCSR<u>GG</u> <u>SYVMDY</u>WGQGTSTVTVSS	47

47F5-VL	DVVMTQSRKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGTSVA</u> WYQQKLGQSPKALIY <u>S</u> <u>ASYRYS</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF C <u>QODNSYPHT</u> FGG GTKLEIK	48
104A3-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKVSCTGSGFNIK <u>DYYIH</u> WVKQRTEQGLEWIGR <u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQGG</u> KATITSDTSSNTAYLQLSSL TSGDTAVYFCARY <u>D</u> <u>GYycFDY</u> WGQGTTTLTVSS	49
104A3-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKPLIY <u>S</u> <u>TSYRYS</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSADLAAYF C <u>QOYNNYPYT</u> FGG GTRLEIK	50
106A7-VH	EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTTSGFNIK <u>DYYMH</u> WVNQRTEQGLEWIGR <u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQGG</u> KATITADTSSNTAYLQLSSL TSEDVAVYYCARD <u>W</u> <u>GHSFDY</u> WGQGTTTLTVSS	51
106A7-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGTTVA</u> WYQQKPGQSPKTLIY <u>S</u> <u>ASYRYS</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF C <u>QOYNSYT</u> FGGGT	52

	KLEMK	
107E12-VH	EVQLQQSGAEFVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DYYIHW</u> VTQKTEQGLEWIG <u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQD</u> KATITADSSSNTAYLQLSSL TSVDTAVYFCS <u>REG</u> <u>SFTGWFPY</u> WGQGTLSVSA	53
370E5-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KARQSVGTYVA</u> WYQQKPGQSPKALI <u>S</u> <u>TSYRYN</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADY FC <u>QQYHSYPYTF</u> GG GTKLEIK	54
124D12-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKVSCVTGSGFN <u>IKDYYIH</u> WVKQRTEQGLEWIG <u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQGR</u> ATITSDTSSNTAYLQLSSL TSGDTAVYYCARY <u>D</u> <u>GYYCFDY</u> WGQGTTLTVSS	55
124D12-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKPLI <u>S</u> <u>TSYRYS</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSADLAAYF C <u>QQYNNYPYTF</u> GG GTRLEIK	56
260H8-VH	EVQLQESGPGGLAKPSQTLSTCSVTGYSIT <u>SDYWNW</u> IRKFPGNKLEYMG <u>Y</u>	57

	<u>ISYSGSIYYNPSLKS</u>RISITRDTSKNQYYLQLNSVTNE DTATYYCAR<u>SGG</u> <u>MYYFDY</u>WGQGTTLTVSS	
260H8-VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC<u>RASGNIHNYLAWY</u> QQKQGKSPQLLVY<u>N</u> <u>AKTLED</u>GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYY <u>CQHFWSIPPTFGS</u> GTKLEIK	58
268E9-VH	EVQLQESGPGLAKPSQTLSTCSVTGYSIT<u>SDYWNW</u> IRKFPGNKLEYMG<u>Y</u> <u>ISYSGSIYYNPSLKS</u>RISITRATSKNQYYLQLNSVTNE DTATYYCAR<u>SGG</u> <u>MYYFDY</u>WGQGTTLTVSS	59
268E9-VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC<u>RASGNIHNYLAWY</u> QQKQGKSPQLLVY<u>N</u> <u>AKTLED</u>GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYY <u>CQHFWSIPPTFGS</u> GTKLEIK	60
269A7-VH	EVQLQESGPGLAKPSQTLSTCSVTGYSIT<u>SDYWNW</u> IRKFPGNKLEYMG<u>Y</u> <u>ISYSGTIYYNPSLKS</u>RISITRDTSKNQYYLQLNSVTN EDTATYYCAR<u>SGG</u> <u>MYYFDY</u>WGQGTTLTVSS	61

269A7-VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC<u>RASGNIHNYLAWY</u> QKQKSPQLLVY<u>N</u> <u>AKTLED</u>GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYY C<u>QHFW</u>SIPPTFGS GTKLEIK	62
293H10-VH	EVQLQESGPGLAKPSQTLSTCSVTGYSIT<u>SDYWNW</u> IRKFPGNKLEYMG<u>Y</u> <u>ISYSGNTDYNPSLKS</u>RFSITRDTSKNQFYQLNSVTT EDTATYYCAR<u>SEG</u> <u>MYFFDY</u>WGQGTTLTVSS	63
293H10-VL	DIQMTQSPASLSASVGETVSITC<u>RASGNIHNYLAWY</u> HQKQKSPQLLVY<u>N</u> <u>AKTLAD</u>GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSY YC<u>QHFW</u>STPPTFGS GTKLEIK	64
370E5-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK<u>DYYIHW</u> VKQRTEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQG</u>KATITADTSSNTAYLQLSSL TSEDVAVYYCAR<u>FG</u> <u>GLTAMDY</u>WGQGTSTVTVSS	65
370E5-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKALIYA<u>A</u> <u>TSYRYS</u>GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF C<u>QQYNNYPYT</u>FGG	66

	GTKLEIK	
392D6-VH	AVQLQQSGTELVKPGASVKLSCSASGFNIK <u>DYYVH</u> WVKQKTEQGLEWIG <u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQG</u> KATVTADTSSNTAYMQLSS LTSEDTAVYYCT <u>RF</u> G <u>GLDAMDY</u> WGQGTSVTVSS	67
392D6-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKPLI <u>S</u> <u>TSYRYN</u> GVPDRFTGSGSGTEFTLTISNVQSEDLAEYF C <u>QQFNRY</u> PYTFGG GTKLEIK	68
402G3-VH	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGFTFT <u>SHFIH</u> WI KQQPGNGLKWIG <u>W</u> <u>IYPGDDDTEYNH</u> KFNGKATLTADKSSSTAYMHLSS LTSEDSAVYFCAR <u>RV</u> <u>EYYNGGFAY</u> WGQGLVTVSS	69
402G3-VL	DVQMTQSPSYLAAPPGESVSISC <u>KASKNIRNNLG</u> WY QERPGKTPNLLI <u>H</u> S <u>GSTLQS</u> GAPSRFSGGGSGTDFTLTIRSLESEDSAVYY C <u>QQYDQYPL</u> TFGS GTKLEIK	70
430H6-VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCTFSGFSLN <u>TYGMGV</u> <u>G</u> WIRQPSGKGLEWL	71

	<u>ANIWWDDDKYYNPSLKN</u>RLTISKDTSNNQAFLKIT NVD TADTATYFCAR<u>H</u> PLPGYKDNYVVDAWGQASVTVSS	
430H6-VL	DVVLTQTPGSLSVTLGDQASISC<u>RSSQSLEYSDQYT</u> <u>YLE</u>WYLQKSGQSPQ LLIY<u>GVSNRFS</u>GVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDL GVYYC<u>FQATHDP</u> <u>YTF</u>GAGTKLELK	72
485G10-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIK<u>DYYIHW</u> VKQRTEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQ</u>GKATITADTSSNTAYLQLSSL TSEDTVVYYCGR<u>YH</u> <u>GYWALDY</u>WGQGTSVTVSS	73
485G10-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC<u>KTSQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKPLIY<u>S</u> <u>TSYRYS</u>GVPDRFTGSGSGTDFTLIISNVQSEDLAEYF C<u>HQYFSYPYTF</u>GG GTLLEIK	74
487E3-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCSASGFNIK<u>DCYIHW</u> VKQRTEQGLEWIG<u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQ</u>AKATITADTSSNTAYLQLNSL TSEDTAVYYCAR<u>HC</u> <u>NFLYFDY</u>WGQGSTLTVS	75

487E3-VL	DIVMTQSQKSMSTSLGDRVTVTC <u>KASQNVGTIVAW</u> YQLKPGQSPKTLIY <u>S</u> <u>ASYRSS</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF <u>CQQYNNYPVIFGS</u> GTKLEIR	76
----------	--	----

Пример 2. Связывающие свойства моноклональных антител мыши против IFNAR-1

В данном примере тестировали связывающие свойства антител мыши против белков IFNAR-1 человека посредством твердофазного ИФА. Вкратце, IFNAR-1 с маркером His иммобилизовали в количестве 0,5µг/мл в течение ночи, а затем блокировали 5% БСА в PBS. Последовательно разбавленные антитела против IFNAR-1 инкубировали с иммобилизованным антигеном в течение 1 ч при комнатной температуре. Полученные планшеты промывали PBS/Т и инкубировали с антителом козы-ПХ против IgG мыши в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты проявляли с субстратом ТМВ и анализировали на спектрофотометре при OD 450–630 нм. Сводные результаты твердофазного ИФА приведены в **таблице 2**, где показаны значения EC₅₀ связывания с белком IFNAR-1 человека.

Таблица 2. EC₅₀ (нМ) связывания с белком hIFNAR-1.

Антитело	EC ₅₀ (нМ)	Антитело	EC ₅₀ (нМ)
4D8	0,067	269A7	0,476
8G11	0,069	293H10	0,097
34H8	0,064	370 E5	0,052
104A3	0,056	392D6	0,054
106A7	0,099	402G3	0,137
107 E12	0,075	430H6	0,733
124D12	0,062	485G10	0,015
260H8	0,055	487 E3	0,028
268 E9	0,088		

Анализ антитела против IFNAR-1 на BIACORE

Связывание антител с рекомбинантным белком IFNAR-1-ECD человека с His-маркером тестировали с применением способа захвата в системе Biotec T200. Антитела против IFNAR-1 захватывали с использованием антитела против Fc человека или белка А, иммобилизованного на чипе. Последовательные концентрации белка IFNAR-1-ECD человека с his-маркером (0-8 нМ) вводили поверх захваченных антител при скорости потока 30 μ л/мин. Фазы диссоциации составляли 600 с или 1200 с. Результаты показаны ниже в **таблице 3**. Результаты Biotec для антител против IFNAR-1 демонстрируют, что эти антитела против IFNAR-1 обладали высоким сродством связывания с IFNAR-1 человека.

Таблица 3. Связывание антител с рекомбинантным белком IFNAR-1

Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
4D8	2,31E+06	9,03E-05	3,90E-11
8G11	2,36E+06	6,40E-05	2,71E-11
34H8	2,37E+06	4,41E-05	1,86E-11

Пример 3. Анализ с использованием репортера, реагирующего на ИФН, для скрининга моноклональных антител мыши против IFNAR -1

Клетки HEK-Blue™ ИФН α/β (InvivoGen) специально предназначены для отслеживания активации пути JAK-STAT, индуцируемого ИФН I типа. При стимуляции ИФН- α или ИФН- β эти клетки активируют путь JAK-STAT, а затем экспрессию репортерного гена, называемого секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазой (SEAP). SEAP, секретируемую в супернатант, легко обнаружить с использованием реагента QUANTI-Blue™ (InvivoGen) для детектирования SEAP. Нейтрализующее антитело, блокирующее связывание интерферона с его рецептором, ингибирует экспрессию репортерного гена, индуцируемого ИФН. Этот репортерный анализ использовали для скрининга моноклональных антител мыши против IFNAR-1.

Клетки HEK-Blue™ ИФН α/β инкубировали с 400 ед/мл ИФН α 2b в присутствии последовательно разбавленных моноклональных антител мыши против IFNAR-1 в течение ночи. Экспрессию репортерного гена SEAP определяли с помощью спектрофотометра при длине волны 650 нм. EC₅₀ протестированных антител перечислены в таблице 4. Среди этих антител 4D8, 8G11, 34H8, 485G10 и 487E3

демонстрировали превосходное блокирование сигнала ИФН α 2b. С учетом анализа гомологии последовательностей клоны 8G11 и 485G10 отобрали для дальнейшей гуманизации и исследования характеристик.

Таблица 4. Репортерный анализ антител

5

Идентификатор клона	ЕС ₅₀ (нМ)	Идентификатор клона	ЕС ₅₀ (нМ)
4D8	0,460	286E9	3,871
8G11	0,465	293H10	1,285
34H8	0,560	370E5	2,170
104A3	1,310	392D6	0,824
106A7	3,516	402G3	1,267
107E12	1,207	430H6	1,297
124D12	0,981	485G10	0,286
260H8	5,074	487E3	0,161
269A7	6,713		

Пример 4. Гуманизация мАт против IFNAR-1

А. 8G11

10 Гены вариабельных областей антитела мыши 8G11 использовали для создания гуманизированного мАт. На первом этапе указанного процесса аминокислотные последовательности VH и VK 8G11 сравнивали с последовательностями генов Ig человека из доступной базы данных для выявления в целом наилучшим образом совпадающих генных последовательностей зародышевой линии Ig человека. Для
15 тяжелой цепи ближайшее совпадение в геноме человека приходилось на ген *IGHV1-46*01*. Для легкой цепи наилучшее совпадение в геноме человека приходилось на ген *IGKV1-9*01*.

Затем конструировали последовательности гуманизированного вариабельного домена, причем последовательности CDR1 (SEQ ID NO:77), 2 (SEQ ID NO:78) и 3 (SEQ ID
20 NO:80) 8G11 VH пересаживали на каркасные последовательности гена *IGHV1-46*01*, а CDR1 (SEQ ID NO:81), 2 (SEQ ID NO:82) и 3 (SEQ ID NO:83) легкой цепи 8G11 пересаживали на каркасные последовательности гена *IGKV1-9*01*. Затем генерировали 3D-модель с целью определения наличия положений в каркасных участках, где замена аминокислоты мыши на аминокислоту человека могла влиять на связывание и/или
25 конформацию CDR. В случае тяжелой цепи в каркасной области человека выявили K12,

V20, A24, R38, M48, V68, M70, R72, V79 и M81 (нумерация по Kabat) и подвергли их обратным мутациям в соответствующие аминокислоты антитела мыши, т.е. K12V, V20L, A24G, R38K, M48I, V68A, M70I, R72A, V79A и M81L. В случае легкой цепи в каркасной области человека выявили I21, A43, L46, T74, M70, R72, L78 и Y87 (нумерация по Kabat) и подвергли их обратным мутациям в соответствующие аминокислоты антитела мыши, т.е. L4M, A13T, I21V, A43S, L46V, T74I, L78V и Y87F. Между тем мутацию G56 A использовали для удаления PTM.

Таблица 5. Последовательности и CDR 8G11

Цепь или домен антитела	Последовательности (CDR выделены подчеркиванием и полужирным шрифтом)	SEQ ID NO:
8G11-VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGFGFNIK <u>DYYMH</u> HWVKQRAEQGLEWIGR <u>IDPEDGETKYAPKFQG</u> KATITADTSSNTAYLQVSSLTSED TAVYYCARGG <u>IFYVMDY</u> WGQGTSTVTVSS	7
8G11-VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGTNVV</u> WYQQKPGQSPKVLIIYS <u>ASYRVS</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLIIISNVQSEDLAEYFC <u>QQKNNPYT</u> FGG GTKLEIK	8
CDRH1	DYYMH	77
CDRH2	RIDPEDGETKYAPKFQG	78
CDRH2 (модифицированная)	RIDPED <u>A</u> ETKYAPKFQG	79
CDRH3	GGIFYVMDY	80
CDRL1	KASQNVGTNVV	81
CDRL2	SASYRVS	82
CDRL3	QQKNNPYT	83

Гуманизированные последовательности перечислены в **таблице 6**: 8G11-VH1, 8G11-VH2, 8G11-VH3, 8G11-VH4, 8G11-VL1, 8G11-VL2, 8G11-VL3 и 8G11-VL4.

Таблица 6. Гуманизированные последовательности

Цепь антитела	Последовательности (CDR выделены курсивом; обратные мутации выделены полужирным подчеркнутым шрифтом)	SEQ ID NO:
8G11-VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIK <u>DYYMH</u> WVRQAPGQGLEWMGR <u>IDPEDA</u> ETKYAPKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARGG <u>IFYVMDY</u> WGQGTSLTVTVSS	84
8G11-VH2	QVQLVQSGAEV V KPGASVKVSCK G SGFN <u>KDYYMH</u> WVRQAPGQGLEW I GR <u>IDPEDA</u> ETKYAPKFQGRVTMT A DTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARGG <u>IFYVMDY</u> WGQGTSLTVTVSS	85
8G11-VH3	QVQLVQSGAEV V KPGASVKVSCK G SGFN <u>KDYYMH</u> V KQAPGQGLEW I GR <u>IDPEDA</u> ETKYAPKFQGRVT I TADTSTSTVY L ELSSLRSED TAVYYCARGG	86

	<u>NFYVMDYWGQGLTVTVSS</u>	
8G11-VH4	<u>QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKGSGFNIKDYIMHWVKQAPGQGLEWIGR</u> <u>IDPEDAETKYAPKFQGRATITADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARGG</u> <u>NFYVMDYWGQGLTVTVSS</u>	87
8G11-VL1	<u>DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVVWYQQKPGKAPKLLIYS</u> <u>ASYRVSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQKNNYPYTFGQ</u> GTKLEIK	88
8G11-VL2	<u>DIQLTQSPSFLSTSVGDRVTITCKASQNVGTNVVWYQQKPGKSPKVLIIYS</u> <u>ASYRVSGVPSRFSGSGSGTEFTLIISSLQPEDFATYYCQQKNNYPYTFGQ</u> GTKLEIK	89
8G11-VL3	<u>DIQLTQSPSFLSTSVGDRVTITCKASQNVGTNVVWYQQKPGKSPKVLIIYS</u> <u>ASYRVSGVPSRFSGSGSGTEFTLIISSVQPEDFATYFCQQKNNYPYTFGQ</u> GTKLEIK	90
8G11-VL4	<u>DIQMTQSPSFLSTSVGDRVTITCKASQNVGTNVVWYQQKPGKSPKVLIIYS</u> <u>ASYRVSGVPSRFSGSGSGTEFTLIISSVQPEDFATYFCQQKNNYPYTFGQ</u> GTKLEIK	91

Все 16 IgG экспрессировали в линии клеток HEK293. Экспрессию антител выполняли для ранжирования сродства. Подробные сводные данные о ранжировании сродства представлены в **таблице 7**.

5 **Таблица 7. Ранжирование сродства гуманизированных антител.**

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
VH4+VL3	3,01E+05	8,52E-05	2,84E-10
VH2+VL2	2,87E+05	9,42E-05	3,28E-10
VH4+VL2	2,92E+05	9,69E-05	3,32E-10
VH3+VL3	3,01E+05	1,10E-04	3,64E-10
VH2+VL3	2,65E+05	9,65E-05	3,64E-10
VH4+VL4	2,83E+05	1,05E-04	3,72E-10
VH2+VL4	2,62E+05	1,02E-04	3,88E-10
VH3+VL2	2,84E+05	1,11E-04	3,89E-10
VH3+VL4	2,81E+05	1,13E-04	4,01E-10
VH3+VL1	2,56E+05	1,06E-04	4,13E-10
VH2+VL1	2,02E+05	8,84E-05	4,39E-10
VH4+VL1	2,03E+05	9,94E-05	4,89E-10
VH1+VL1	1,48E+05	9,83E-05	6,62E-10
VH1+VL2	1,67E+05	1,27E-04	7,65E-10
VH1+VL4	1,69E+05	1,41E-04	8,36E-10
VH1+VL3	2,31E+05	2,00E-04	8,65E-10

На основании ранжирования сродства выполнили экспрессию и очистку 4 IgG (VH4+VL3, VH2+VL2, VH2+VL1, VH1+VL1). Очищенные антитела дополнительно отбирали для измерения сродства в различных концентрациях. Подробные сводные данные представлены в **таблице 8**.

10

Таблица 8. Сродство отобранных гуманизированных антител.

Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
8G11-H4L3	3,40E+05	7,47E-05	2,20E-10
8G11-H2L2	2,98E+05	1,25E-04	4,19E-10
8G11-H2L1	2,29E+05	9,24E-05	4,03E-10
8G11-H1L1	1,61E+05	2,19E-04	1,36E-09

В. 485G10

- 5 Гены вариабельных областей антитела мыши 485G10 использовали для создания гуманизированного мАт. На первом этапе указанного процесса аминокислотные последовательности VH и VK 485G10 сравнивали с последовательностями генов Ig человека из доступной базы данных для выявления в целом наилучшим образом совпадающих генных последовательностей зародышевой линии Ig человека. Для
- 10 тяжелой цепи ближайшее совпадение в геноме человека приходилось на ген IGHV1-2*05. Для легкой цепи наилучшее совпадение в геноме человека приходилось на ген IGKV1-16*01.

Затем конструировали последовательности гуманизированного вариабельного домена, причем последовательности CDR1 (SEQ ID NO:92), 2 (SEQ ID NO:93) и 3 (SEQ ID

15 NO:95) тяжелой цепи 485G10 пересаживали на каркасные последовательности гена *IGHV1-2*01*, а CDR1 (SEQ ID NO:96), 2 (SEQ ID NO:C5) и 3 (SEQ ID NO:98) легкой цепи 485G10 пересаживали на каркасные последовательности гена *IGKV1-16*01*. Затем генерировали 3D-модель с целью определения наличия положений в каркасных участках, где замена аминокислоты мыши на аминокислоту человека могла влиять на

20 связывание и/или конформацию CDR. В случае тяжелой цепи в каркасной области человека выявили V20, A24, R38, M48, V68, M70, R72, M81, M81, A97 (нумерация по Kabat) и подвергли их обратным мутациям в соответствующие аминокислоты антитела мыши, т.е. V20L, A24G, R38K, M48I, V68A, M70I, R72A, M81L, A97G. В случае легкой цепи в каркасной области человека выявили A13, I21, F36, S46, L78, V104 (нумерация

25 по Kabat) и подвергли их обратным мутациям в соответствующие аминокислоты антитела мыши, т.е. A13T, I21V, F36Y, S46P, L78V, V104L. Между тем мутацию G56 A использовали для удаления PTM.

Таблица 9. Последовательности и CDR 485G10

Цепь или домен антитела	Последовательности (CDR выделены подчеркиванием и полужирным шрифтом)	SEQ ID NO:
485G10- VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIK <u>DYYIH</u> HWVKQRTTEQGLEWIG <u>R</u> <u>IDPEDGETKYAPKFQG</u> KATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTVVYYCGR <u>YH</u> <u>GYWALDY</u> WGQGTSTVTVSS	73
485G10- VL	DI VMTQSQKF MSTSVGDRVSVTC <u>KTSQNVGTNVA</u> WYQQKPGQSPKPLIY <u>S</u> <u>TSYRYS</u> GVDPDRFTGSGSGTDFTLII SNVQSEDLAEYFC <u>HQYFSYPYT</u> FGG GTLLEIK	74
CDRH1	DYYIH	92
CDRH2	RIDPEDGETKYAPKFQG	93
CDRH2 (модифицированная)	RIDPED <u>A</u> ETKYAPKFQG	94
CDRH3	YHGYWALDY	95
CDRL1	KTSQNVGTNVA	96
CDRL2	TSYRYS	97
CDRL3	HQYFSYPYT	98

Гуманизированные последовательности перечислены в **таблице 10**: 485G10-VH0, 485G10-VH1, 485G10-VH2, 485G10-VH3, 485G10-VL1, 485G10-VL2, 485G10-VL3 и 485G10-VL4.

5 **Таблица 10. Гуманизированные последовательности**

Цепь антитела	Последовательности (CDR выделены курсивом и подчеркиванием; обратные мутации выделены полужирным шрифтом)	SEQ ID NO:
485G10- VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIK <u>DYYIHWVRQAPGQGLEWMGR</u> <u>IDPEDAETKYAPKFQ</u> GRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTVVYYCARYH GYWALDYWGQGTTLTVSS	99
485G10- VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIK <u>DYYIHWVRQAPGQGLEWMGR</u> <u>IDPEDAETKYAPKFQ</u> GRVTMT <u>AD</u> TSISTAYMELSRRLRSDDTVVYYCARYH GYWALDYWGQGTTLTVSS	100
485G10- VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVK <u>L</u> SCKASGFNIK <u>DYYIHWVK</u> QAPGQGLEW <u>I</u> GR <u>IDPEDAETKYAPKFQ</u> GRVTMT <u>AD</u> TSISTAYMELSRRLRSDDTVVYYC <u>G</u> RYH GYWALDYWGQGTTLTVSS	101
485G10- VH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVK <u>L</u> SCK <u>G</u> SGFN <u>I</u> K <u>DYYIHWVK</u> QAPGQGLEW <u>I</u> GR <u>IDPEDAETKYAPKFQ</u> <u>GRATIT</u> ADTSISTAY <u>L</u> ELSRRLRSDDTVVYYC <u>G</u> RYH GYWALDYWGQGTTLTVSS	102
485G10- VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>KTSQNVGTNVA</u> WFQQKPGKAPKSLIY <u>S</u> <u>TSYRYS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS <u>S</u> LQPEDFATY <u>YCHQYFSYPYT</u> TFGP GTKVDIK	103
485G10- VL2	DIQMTQSPSSLS <u>T</u> SVGDRVITITC <u>KTSQNVGTNVA</u> WYQQK <u>P</u> GKAPKPLIY <u>S</u> <u>TSYRYS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS <u>S</u> LQPEDFATY <u>YCHQYFSYPYT</u> TFGP GTKVDIK	104
485G10- VL3	DIQMTQSPSSLS <u>T</u> SVGDRVITITC <u>KTSQNVGTNVA</u> WYQQK <u>P</u> GKAPKPLIY <u>S</u> <u>TSYRYS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS <u>V</u> QPEDFATY <u>YCHQYFSYPYT</u> TFGP GTK <u>L</u> DIK	105

485G10-VL4	DIQMTQSPSSLS T SVGDRVT V TCKTSQNVGTNVAW Y QQK P GKAPKPLI Y TSYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLT I SS V QPEDFATYYC H QYFSYPYTFGP GTK L DIK	106
------------	--	-----

Все 16 IgG можно было экспрессировать в линии клеток HEK293. Экспрессию антител выполняли для ранжирования сродства. Подробные сводные данные о ранжировании сродства представлены в **таблице 11**.

5 **Таблица 11. Ранжирование сродства гуманизированных антител.**

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
VH1+VL3	3,11E+05	1,01E-04	3,25E-10
VH1+VL2	3,08E+05	2,01E-04	6,52E-10
VH1+VL4	3,27E+05	2,16E-04	6,60E-10
VH2+VL3	2,81E+05	2,38E-04	8,48E-10
VH3+VL2	3,06E+05	2,64E-04	8,64E-10
VH3+VL4	3,54E+05	2,71E-04	7,66E-10
VH3+VL3	3,32E+05	2,79E-04	8,41E-10
VH2+VL2	3,29E+05	2,98E-04	9,06E-10
VH2+VL4	3,03E+05	3,00E-04	9,90E-10
VH0+VL3	2,94E+05	3,16E-04	1,07E-09
VH0+VL4	2,55E+05	3,18E-04	1,25E-09
VH0+VL2	2,79E+05	4,39E-04	1,57E-09
VH1+VL1	3,28E+05	1,03E-03	3,14E-09
VH0+VL1	5,09E+05	4,75E-03	9,33E-09
VH2+VL1	3,23E+05	6,63E-03	2,05E-08
VH3+VL1	9,71E+05	1,85E-02	1,91E-08

На основании ранжирования сродства выполнили экспрессию и очистку 4 IgG (VH1+VL2, VH1+VL4, VH1+VL3, VH2+VL3). Очищенные антитела дополнительно отбирали для измерения сродства в различных концентрациях. Подробные сводные
10 данные представлены в **таблице 12**.

Таблица 12. Сродство отобранных гуманизированных антител.

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
485G10-H1L2	2,07E+05	3,21E-04	1,55E-09
485G10-H1L4	1,96E+05	2,59E-04	1,32E-09
485G10-H1L3	1,87E+05	2,32E-04	1,24E-09
485G10-H2L3	1,86E+05	3,66E-04	1,96E-09

Пример 5. Гуманизированные моноклональные антитела против IFNAR-1 ингибируют биологическую активность интерферона $\alpha 2b$ при анализе с использованием репортера, реагирующего на ИФН

Для оценки блокирующей функции гуманизированных антител по отношению к IFNAR-1 использовали анализ с использованием репортера, реагирующего на ИФН *in vitro*, описанный в примере 3. Клетки HEK-BlueTM ИФН α/β инкубировали с 400 ед/мл ИФН $\alpha 2b$ в присутствии последовательно разбавленных гуманизированных моноклональных антител против IFNAR-1 в течение ночи, а затем определяли с использованием спектрофотометра при длине волны 650 нм. Как показано на **фиг. 1**, антитела 8G11H и 485G10H эффективно блокировали ИФН $\alpha 2b$ -индуцированную экспрессию репортерного гена. Их эффективность была сопоставима с эффективностью соответствующих химерных антител.

Пример 6. Гуманизированные моноклональные антитела против IFNAR-1 ингибируют биологическую активность интерферона $\alpha 2b$ при пролиферации клеток Daudi

Клетки линии Daudi, происходящей от В-лимфобластной лимфомы Беркитта человека, экспрессируют высокие уровни IFNAR, и рост этих клеток ингибируют интерфероны I типа. Для измерения функциональной блокирующей способности гуманизированных антител против IFNAR-1 клетки Daudi культивировали с интерфероном $\alpha 2b$ в присутствии или в отсутствие последовательно разбавленных гуманизированных антител против IFNAR-1. Пролиферацию клеток измеряли с использованием набора для подсчета клеток Cell Counting Kit-8 (CCK8, DOJINDO Laboratories). Как описано на **фиг. 2**, антитела 8G11H и 485G10H купировали ингибирование пролиферации клеток Daudi, опосредованное ИФН $\alpha 2b$, в зависимости от дозы. Их эффективность была сопоставима с эффективностью соответствующих химерных антител.

Пример 7. Моноклональные антитела против IFNAR-1 человека ингибируют биологическую активность различных интерферонов I типа

Для оценки способности гуманизированных антител против IFNAR-1 ингибировать биологическую активность различных ИФН I типа различные подтипы ИФН-альфа

тестировали в анализе с использованием репортера, реагирующего на ИФН. Клетки HEK-Blue™ ИФН-α/β инкубировали с одним из следующих подтипов ИФН-альфа: 1, 2а, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 16, 17 и 21 в присутствии последовательно разбавленных тестируемых антител или изотипического контроля. Сигнал репортера определяли, как описано в примере 3. Как показано в **таблице 13**, антитела 8G11H и 485G10H могли эффективно ингибировать клеточный сигнал, вызываемый различными ИФН I типа. Их значения EC₅₀ находились на уровне пМ.

Таблица 13. Репортерный анализ различных ИФН I типа

Идентификатор клона	EC ₅₀ (нМ)		Идентификатор клона	EC ₅₀ (нМ)	
	8G11H	485G10H		8G11H	485G10H
ИФНα 1	0,057	0,051	ИФНα 8	0,604	0,490
ИФНα 2a	0,052	0,048	ИФНα 10	0,402	0,550
ИФНα 4	0,055	0,054	ИФНα 14	0,215	0,153
ИФНα 5	0,087	0,098	ИФНα 16	0,061	0,079
ИФНα 6	0,090	0,072	ИФНα 17	0,035	0,035
ИФНα 7	0,039	0,047	ИФНα 21	0,079	0,065

Пример 8. Моноклональные антитела против IFNAR-1 человека ингибируют противовирусную функцию, опосредуемую ИФН I типа

ИФН I типа были впервые выявлены из-за их уникальной противовирусной функции. Для оценки блокирующего действия антител против IFNAR-1 на противовирусную функцию, опосредуемую ИФН I типа, разработали противовирусный анализ на основе ИФН α 2b. Вкратце, сконструировали линию клеток Huh7, содержащую полноразмерный репликон ВГС генотипа 1b (Con1b), присоединенный к репортерному гену люциферазы светлячка. Встречаемость репортерного гена строго коррелировала с уровнем репликации репликона ВГС. Активность антител против IFNAR-1 в отношении блокирования противовирусной функции, индуцируемой ИФН α 2b, можно определить по восстановлению уровней репортерного гена в клетках Huh7-Con1b, обработанных ИФН α 2b.

Клетки Huh7-Con1b культивировали с 400 ед/мл ИФН α 2b в присутствии или отсутствие последовательно разбавленных гуманизированных моноклональных антител против IFNAR-1 в течение 48 часов. Экспрессию репортерного гена люциферазы светлячка измеряли путем добавления реагента Britelite plus и дополнительно определяли с

помощью спектрофотометра. Как показано в таблице 14, гуманизированные моноклональные антитела против IFNAR-1 8G11H и 485G10H эффективно индуцировали противовирусную функцию, индуцируемую ИФН α 2b, их EC50 были сопоставимы с аналогичным параметром соответствующих химерных антител.

5 Таблица 14. Анализ противовирусной активности, опосредованной ИФН α 2b

Идентификатор клона	EC ₅₀ (нМ)
8G11- химерное	7,733
8G11H	8,067
485G10-химерное	16,267
485G10H	13,867

**Пример 9. Ингибирование секреции IP-10, индуцированной ИФН I типа,
гуманизированными моноклональными антителами против IFNAR-1**

При стимуляции ИФН I типа нормальные мононуклеары периферической крови (МПК) экспрессируют ряд генов ответа на ИФН, в том числе IP-10. Активность антител против IFNAR-1 тестировали на предмет ингибирования ИФН α 2b-индуцированной секреции IP-10 нормальными МПК.

МПК инкубировали с 400 ед/мл ИФН α 2b в присутствии или в отсутствие гуманизированных моноклональных антител против IFNAR-1 в течение 48 часов. Собирали супернатанты и анализировали в них концентрацию IP-10 с помощью набора LANCE для количественного анализа (Cisbio) в соответствии с инструкциями изготовителя. Как показано на фиг. 3, гуманизированные моноклональные антитела против IFNAR-1 8G11H и 485G10H ингибировали секрецию IP -10 культурой нормальных PBMC, индуцированную рекомбинантным IFN α 2b, в зависимости от дозы.

**Пример 10. Ингибирование развития дендритных клеток, индуцированного IFN I
типа, гуманизированными моноклональными антителами против IFNAR-1**

Хорошо известно, что ИФН I типа индуцируют развитие и созревание дендритных клеток, определяемое по экспрессии специфических маркеров клеточной поверхности, например, CD38, CD80 и CD86 и т.д., и способности стимулировать пролиферацию наивных аллогенных CD4⁺ Т-клеток (реакция смешанной культуры лимфоцитов, MLR). Для оценки функции антител против IFNAR-1 в отношении блокирования влияния

сигнального пути ИФН I типа на дифференцировку дендритных клеток разработали анализ дифференцировки дендритных клеток, опосредованной ИФН α 2b. Моноциты, выделенные из МПК человека, культивировали с 20 нг/мл ГМКСФ и 400 ед/мл ИФН α 2b в присутствии или в отсутствие гуманизированных моноклональных антител против IFNAR-1 в течение 72 часов. Дендритные клетки, происходящие от моноцитов, собирали и дополнительно культивировали с наивными аллогенными CD4⁺ Т-клетками человека в соотношении 1:5 в течение 5 дней. Цитокин ИФН- γ , отражающий статус пролиферации CD4⁺ Т-клеток, анализировали в супернатантах культуры посредством твердофазного ИФА.

Как показано на **фиг. 4**, добавление гуманизированных моноклональных антител против IFNAR-1 8G11H или 485G10H в системы дифференцировки приводило к значительному снижению экспрессии маркеров клеточной поверхности CD38 и CD86, а также к очевидным нарушениям ответа в MLR, демонстрируемым по снижению продукции ИФН- γ CD4⁺ Т-клетками (**фиг. 5**). Результаты продемонстрировали, что гуманизированные моноклональные антитела против IFNAR-1 8G11H и 485G10H могли эффективно блокировать влияние сигнального пути ИФН α 2b на развитие дендритных клеток.

Пример 11. Ингибирование развития дендритных клеток, опосредованного плазмой пациентов с СКВ, гуманизированными моноклональными антителами против IFNAR -1

Способность плазмы пациентов с СКВ индуцировать развитие дендритных клеток коррелирует с активностью заболевания и зависит от действия ИФН α . В данном примере очищенные антитела против IFNAR-1 человека 8G11H и 485G10H тестировали на предмет ингибирования развития дендритных клеток, индуцированного плазмой пациентов с СКВ, которое оценивали по нарушениям способности дендритных клеток, обработанных антителом, стимулировать пролиферацию наивных аллогенных CD4⁺ Т-клеток (MLR).

Моноциты, выделенные из МПК человека, культивировали в среде, содержащей 25% плазмы пациента с СКВ, в присутствии или в отсутствие антител против IFNAR-1 (15 μ г/мл) в течение трех-пяти суток. Затем дифференцированные клетки собирали и

культивировали совместно с наивными аллогенными CD4⁺ Т-клетками человека в соотношении 1:5 в течение пяти дней. Цитокин ИФН-γ, отражающий статус пролиферации CD4⁺ Т-клеток, анализировали в супернатантах культуры посредством твердофазного ИФА. Как показано на **фиг. 6**, гуманизированные моноклональные антитела против IFNAR-1 8G11H и 485G10H значимо ингибировали ИФН-зависимое развитие дендритных клеток, на что указывало нарушение способности дифференцированных клеток стимулировать MLR и выраженное снижение продукции цитокина ИФН-γ CD4⁺ Т-клетками.

Пример 12. Биспецифичное антитело, мишенями которого должны являться

BAFF и IFNAR-1

В данном примере протестировали возможность сохранения сродства связывания и ингибиторной активности некоторых форматов биспецифичных антител против BAFF/IFNAR1 по отношению к обоим антигенам.

Получили биспецифичное моноклональное антитело с использованием белимуаба (антитела против BAFF) и химерного антитела 8G11. На **фиг. 7** изображена схема четырех спроектированных форматов биспецифичного антитела против IFNAR/BAFF (Bi-BFINR). Связывающие свойства Bi-BFINR по отношению к белку IFNAR-1 человека и белку BAFF человека, соответственно, обнаруживали с помощью твердофазного ИФА. Как показано на **фиг. 8**, формат 1 Bi-BFINF обладал активностью в отношении связывания с IFNAR -1, аналогичной активности антитела 8G11, и активностью в отношении связывания BAFF, сопоставимой с активностью белимуаба. Кроме того, выполнили клеточный анализ для исследования биологической функции Bi-BFINF. Для плеча против IFNAR-1 применяли репортерный анализ на основе ИФН-2b. Как показано на **фиг. 9А**, антитело Bi-BFINF в формате 1 обладало активностью в отношении блокирования сигнального пути ИФН-2b, сопоставимой с химерным антителом 8G11. Для плеча против BAFF выполняли анализ пролиферации В-клеток, индуцированной BAFF. В-клетки, выделенные из миндалин, культивировали с 2 мкг/мл рекомбинантного BAFF в присутствии или в отсутствие Bi-BFINF в течение 72 часов. Реагент glo для титрования клеток добавляли к культурам для определения количества В-клеток. Как показано на **фиг. 9В**, антитело Bi-BFINF в формате 1 демонстрировало

улучшенную активность в отношении блокирования BAFF-индуцированной пролиферации В-клеток.

Пример 13. Выявление критических для связывания с 8G11 аминокислот в hIFNAR-1

5 Для картирования эпитопа антитела 8G11 создали библиотеку мутаций (сканирования аланином) hIFNAR-1(1 АК - 409 АК). Связывание Fab 8G11 с каждым мутантных клонов в библиотеке сканирования аланином определяли в двух повторностях с помощью высокопроизводительной проточной цитометрии. В каждый момент фоновую флуоресценцию вычитали из необработанных данных, которые затем нормировали по

10 способности Fab реагировать с белком-мишенью дикого типа. Для каждого мутантного клона строили график средней величины связывания как функции экспрессии (представленной реакционной способностью в отношении контроля). мАт 85288 (R&D) и анифролумаб использовали в качестве контрольного антитела. Для предварительного выявления основных критических клонов использовали пороговое значение > 70%

15 связывания белка дикого типа с контрольным мАт или Fab 8G11 и < 30% связывания белка дикого типа с тестируемым Fab 8G11.

Результаты скрининга мутаций перечислены в **таблице 15**. Клон H273A соответствовал заданным пороговым значениям, однако его снижающаяся активность связывания и близость к критическим остаткам указывали, что мутированный остаток мог входить в

20 состав эпитопа антитела. Критические остатки, мутации в которых приводили к минимальным значениям способности реагировать со специфичными антителами, выделены полужирным подчеркнутым шрифтом. Проверенные критические остатки представляют собой аминокислоты, боковые цепи которых вносят наибольший энергетический вклад во взаимодействие с эпитопом антитела. Таким образом,

25 выделенные (полужирным подчеркнутым шрифтом) остатки K276, K278, вероятно, вносят основной энергетический вклад в связывание. Результаты показаны в **таблице 16**.

Таблица 15. Выявление остатков, критических для связывания с Fab 8G11.

Реакционная способность связывания (% от ДТ)			
Мутация	Fab 8G11	мАт 85288	мАт анифролумаб

H273A	31,2	95,5	88,1
L274A	22,7	115,1	105,6
Y275A	19,1	86,8	145,5
K276A	1,5	104,4	99,4
K278A	3,9	101,2	105,1

Таблица 16. Остатки, важные для связывания Fab с белком hIFNAR-1.

Название антитела	Остатки
8G11	H273, L274, Y275, K276, K278

Анализ конкуренции использовали для тестирования способности антител 4D8, 8G11, 4B12, 30C8, 30B5, 34H8 и анифролумаба конкурировать друг с другом. Результаты показали, что 4D8, 8G11, 4B12, 30C8, 30B5 и 34H8 конкурировали друг с другом, но ни одно из них не конкурировало с анифролумабом за связывание с IFNAR-1. Эти данные показали, что мишенью вновь выявленных антител являлся один и тот же эпитоп на IFNAR-1, отличающийся от эпитопа для анифролумаба.

Пример 14. Фармакокинетика гуманизированных антител против IFNAR1 у яванских макаков

Предварительное исследование фармакокинетики (ФК) выполняли у яванских макаков в дозе 10 мг/кг 8G11-H2L1 и 485G10-H1L3. Образцы сыворотки собирали в моменты времени – 0 (перед введением), 5 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 24 ч (1 день), 48 ч (2 дня), 72 ч (3 дня), 96 ч (4 дня), 120 ч (5 дней), 168 ч (7 дней), 240 ч (10 дней), 36 ч (14 дней), 504 ч (21 день), 672 ч (28 дней) и 840 ч (35 дней) относительно инъекции антитела. Уровни мАт против IFNAR1 измеряли с помощью обычного твердофазного ИФА с использованием ECD рекомбинантного белка IFNAR1 в качестве антигена для захвата. Параметры ФК рассчитывали на основании статистической теории моментов в программном обеспечении WinNonlin 6.3. Результаты показаны в таблице 17.

Профили время-концентрация указывали, что ФК 8G11-H2L1 и 485G10-H1L3 более соответствовали ожиданиям для типичного IgG (фиг. 10А и 10В),

Таблица 17. Параметры ФК 8G11-H2L1 и 485G10-H1L3 у яванских макаков

в/в 10 мг/кг	485G10-H1L3	8G11-H2L1
-----------------	-------------	-----------

HL_Lambda_z	ч	41,9	71,37
T _{мвкс}	ч	0,08	0,08
C _{макс}	мкг/мл	299,05	241,32
ППК _{посл}	ч*мкг/мл	12942,47	15450,93
Vz_F_obs	мл/кг	46,4	65,6
Cl_F_obs	мл/ч/кг	0,77	0,64
MPT _{посл}	ч	62,43	99,49

Пример 15. Фармакодинамика гуманизированных антител против IFNAR1 у яванских макаков

- Фармакодинамическую модель предназначали для использования в исследовании
- 5 способности антител против IFNAR1 ингибировать активность интерферона *in vivo*. Яванских макаков обрабатывали путем в/в вливания 10 мг/кг 8G11-H2L1 и 485G10-H1L3 или контрольной среды-носителя с последующим в/м введением ИФН- α 2b человека ($3 \cdot 10^6$ ед/кг). После обработки и инъекции ИФН- α 2b собирали кровь перед введением, через 24, 72 и 168 ч после обработки для измерения маркера ФД. Экспрессию
- 10 CD11C, CD38, CD86, МНС I класса, МНС II класса и IFN-альфа R1 обнаруживали посредством FACS общих МПК. Как показано на **фиг. 11А**, 8G11-H2L1 и 85G10-H1L3 могли значимо снижать экспрессию HLA-DR в CD14⁺ клетках через 24 ч после обработки. При этом 8G11-H2L1 и 485G10-H1L3 также могли подавлять экспрессию ИФН-альфа R1 в CD14⁺ клетках как через 24, так и 72 ч после обработки.
- 15 Уровни неоптерина и бета-2-микроглобулина обезьяны в сыворотке обнаруживали посредством твердофазного ИФА, выполненного в соответствии с инструкциями производителя. Уровень СРБ в периферической крови измеряли посредством биохимического анализа крови. Как показано на **фиг. 11В**, уровни неоптерина, бета-2-микроглобулина и СРБ в группк среды-носителя быстро увеличивались в течение 24 ч.
- 20 В отличие от контрольной среды-носителя, 8G11-H2L1 и 485G10-H1L3 могли значимо подавлять продукцию неоптерина и бета-2-микроглобулина через 24 ч и 72 ч после введения. Кроме того, 8G11-H2L1 и 485G10-H1L3 могли значимо снижать уровень СРБ через 24 ч после введения.

- Уровни экспрессии сигнатур генов, индуцируемых ИФН I типа в мононуклеарах
- 25 периферической крови, обнаруживали посредством ПЦР в реальном времени. Как показано на **фиг. 11С**, уровни мРНК ISG15, HERC5, IFI27 и IFIT3 быстро увеличивались

в течение 24 ч в группе среды-носителя. В отличие от среды-носителя, 8G11-H2L1 и 485G10-H1L3 значимо блокировали эффекты индукции этих генов за счет ИФН I типа.

* * *

Объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными описанными вариантами реализации, которые следует рассматривать как одиночную иллюстрацию отдельных аспектов настоящего изобретения, и любые функционально эквивалентные композиции и способы входят в рамки настоящего изобретения. Для специалиста очевидно, что в способы и композиции согласно настоящему изобретению можно внести различные модификации и изменения, не выходя за рамки сущности изобретения. Таким образом, подразумевается, что настоящее изобретение включает модификации и изменения данного изобретения при условии, что они соответствуют сущности прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

Все публикации и патентные заявки, упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылок в той же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация или патентная заявка была конкретным и индивидуальным образом указана как включенная посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью к белку субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1), причем указанное антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую области, определяющие комплементарность, тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую области, определяющие комплементарность, легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбраны из группы, состоящей из:

(a) HCDR1: DYYMH (SEQ ID NO: 77), HCDR2: RIDPEDGETKYAPKFQG (SEQ ID NO: 78) или RIDPEDAETKYAPKFQG (SEQ ID NO: 79), HCDR3: GGNFYVMDY (SEQ ID NO: 80), LCDR1: KASQNVGTNVV (SEQ ID NO: 81), LCDR2: SASYRVS (SEQ ID NO: 82) и LCDR3: QQKNNYPYT (SEQ ID NO: 83); и

(b) HCDR1: DYYIH (SEQ ID NO: 92), HCDR2: RIDPEDGETKYAPKFQG (SEQ ID NO: 93) или RIDPEDAETKYAPKFQG (SEQ ID NO: 94), HCDR3: YHGYWALDY (SEQ ID NO: 95), LCDR1: KTSQNVGTNVA (SEQ ID NO: 96), LCDR2: STSYRYS (SEQ ID NO: 97) и LCDR3: HQYFSYPYT (SEQ ID NO: 98).

2. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело.

3. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой: HCDR1: DYYMH (SEQ ID NO: 77), HCDR2: RIDPEDAETKYAPKFQG (SEQ ID NO: 79), HCDR3: GGNFYVMDY (SEQ ID NO: 80), LCDR1: KASQNVGTNVV (SEQ ID NO: 81), LCDR2: SASYRVS (SEQ ID NO: 82) и LCDR3: QQKNNYPYT (SEQ ID NO: 83).

4. Антитело или его фрагмент по п. 3, которое является гуманизированным, и при этом переменная область тяжелой цепи содержит одну или более из обратных

мутаций, выбранных из группы, состоящей из 12V, 20L, 24G, 38K, 48I, 68A, 70I, 72A, 79A и 81L, согласно системе нумерации по Kabat, и их комбинаций.

5. Антитело или его фрагмент по п. 3, которое является гуманизированным, и при этом вариабельная область легкой цепи содержит одну или более из обратных мутаций, выбранных из группы, состоящей из 4M, 13T, 21V, 43S, 46V, 74I, 78V и 87F, согласно системе нумерации по Kabat и их комбинаций.

6. Антитело или его фрагмент по п. 3, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 84-87, или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 84-87.

7. Антитело или его фрагмент по п. 3 или 6, содержащие вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 88-91, или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 88-91.

8. Антитело или его фрагмент по п. 3, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 85, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 88.

9. Антитело или его фрагмент по п. 3, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88.

5

10. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой: HCDR1: DYYIH (SEQ ID NO: 92), HCDR2: RIDPEDAETKYAPKFQG (SEQ ID NO:94), HCDR3: YHGYWALDY (SEQ ID NO: 95), LCDR1: KTSQNVGTNVA (SEQ ID NO: 96), LCDR2: STSYRYS (SEQ ID NO: 97) и LCDR3: HQYFSYPYT (SEQ ID NO: 98).

10

11. Антитело или его фрагмент по п. 10, которое является гуманизированным, и при этом переменная область тяжелой цепи содержит одну или более из обратных мутаций, выбранных из группы, состоящей из 20L, 24G, 38K, 48I, 68A, 70I, 72A, 81L, и 97G, согласно системе нумерации по Kabat и их комбинаций.

15

12. Антитело или его фрагмент по п. 10 или 11, которое является гуманизированным, и при этом переменная область легкой цепи содержит одну или более из обратных мутаций, выбранных из группы, состоящей из 13T, 21V, 36Y, 46P, 78V и 104I,, согласно системе нумерации по Kabat и их комбинаций.

20

13. Антитело или его фрагмент по п. 10, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73 и 99-102, или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73 и 99-102.

25

14. Антитело или его фрагмент по п. 10 или 13, содержащие переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74 и 103-106, или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74 и 103-106.

15. Антитело или его фрагмент по п. 10, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 100, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 105.

16. Антитело или его фрагмент по п. 10, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105.

17. Антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью к белку субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1), причем указанное антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую области, определяющие комплементарность, тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую области, определяющие комплементарность, легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3,

где:

набор HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбран из таблицы А, или наборы CDR получены из таблицы А с добавлением, делецией или заменой одной, двух или трех аминокислот в одной или более из CDR, и

набор LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбран из таблицы А или наборы CDR получены из таблицы А с добавлением, делецией или заменой одной, двух или трех аминокислот в одной или более из CDR.

- 5 18. Антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью к белку субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1), причем указанное антитело или его фрагмент могут связываться с одним или более из аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из H273, L274, Y275, K276 и K278 белка IFNAR1.
- 10 19. Антитело или его фрагмент по п. 18, способные связываться с по меньшей мере двумя из указанных аминокислотных остатков, выбранных из указанной группы.
20. Антитело или его фрагмент по п. 18, способные связываться с по меньшей мере тремя из указанных аминокислотных остатков, выбранных из указанной группы.
- 15 21. Антитело или его фрагмент по п. 18, способные связываться со всеми пятью аминокислотными остатками, выбранными из указанной группы.
- 20 22. Бифункциональная молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к белку субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1), и второй фрагмент, обладающий специфичностью ко второму белку, причем первый антигенсвязывающий фрагмент содержит фрагмент антитела по любому из пп. 1-21.
- 25 23. Бифункциональная молекула по п. 22, отличающаяся тем, что второй фрагмент содержит пептид эдратид (hCDR1) или TACI-Ig.

24. Бифункциональная молекула по п. 22, отличающаяся тем, что второй фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к белку, выбранному из группы, состоящей из BAFF, CD20, CD22, CTLA4, ИЛ-6, CXCL13 и C5.

5

25. Бифункциональная молекула по п. 22, отличающаяся тем, что второй фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к белку фактора выживаемости В-клеток человека (BAFF).

10 26. Бифункциональная молекула по п. 25, имеющая формат, содержащий полноценное антитело, слитое с двумя одноцепочечными фрагментами (scFv) или двумя Fab-фрагментами.

15 27. Бифункциональная молекула по п. 25 или 26, отличающаяся тем, что второй фрагмент содержит антигенсвязывающий фрагмент белидумаба.

28. Композиция, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-21 или бифункциональную молекулу по любому из пп. 22-27 и фармацевтически приемлемый носитель.

20

29. Выделенная клетка, содержащая один или более из полинуклеотидов, кодирующих антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-21 или бифункциональную молекулу по любому из пп. 22-27.

25 30. Полинуклеотид, кодирующий одну или более из цепей антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-21 или бифункциональной молекулы по любому из пп. 22-27.

31. Способ подавления иммунного ответа или лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение указанному пациенту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-21 или бифункциональной молекулы по любому из пп. 22-27.

5

32. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-21 или бифункциональной молекулы по любому из пп. 22-27 для получения лекарственного средства для подавления иммунного ответа или для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у пациента, нуждающегося в этом.

10

33. Способ по п. 31 или применение по п. 32 для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения.

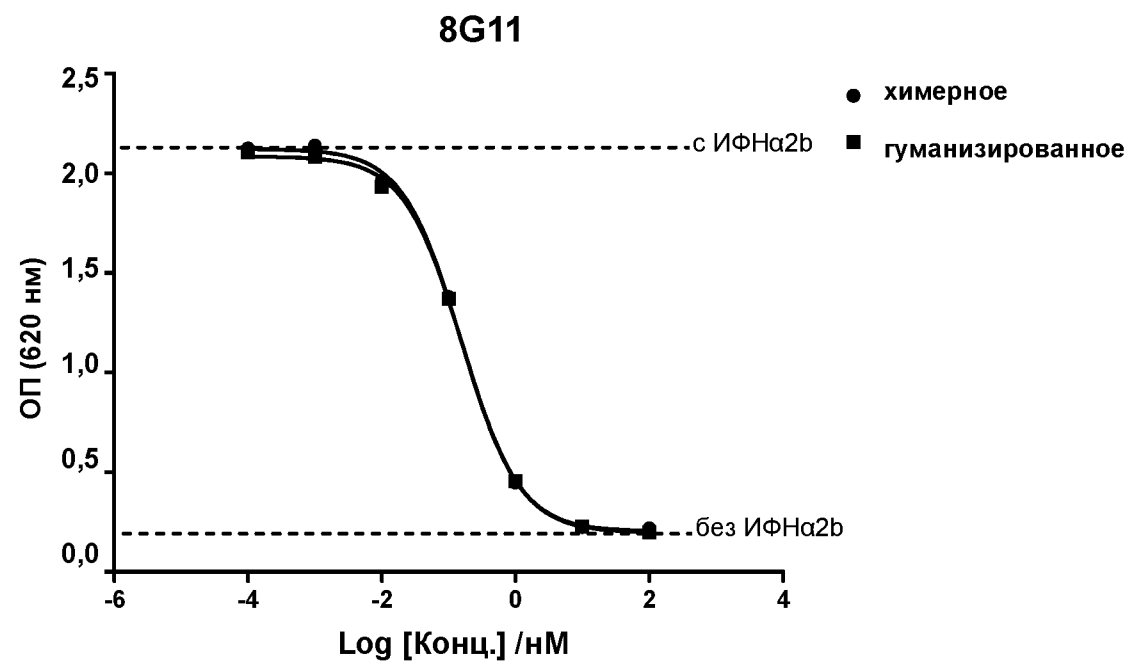
34. Способ по п. 31 или применение по п. 32, отличающиеся тем, что указанное аутоиммунное заболевание или нарушение выбраны из группы, состоящей из диабета 1 типа, ревматоидного артрита (РА), псориаза/псориатического артрита, рассеянного склероза, системной красной волчанки (волчанки), воспалительного заболевания кишечника, болезни Аддисона, болезни Грейвса, синдрома Шёгрена, тиреоидита Хашимото, миастении гравис, васкулита, злокачественной анемии и целиакии.

20

35. Способ по п. 31 или применение по п. 32, отличающиеся тем, что указанное аутоиммунное заболевание или нарушение представляет собой системную красную волчанку.

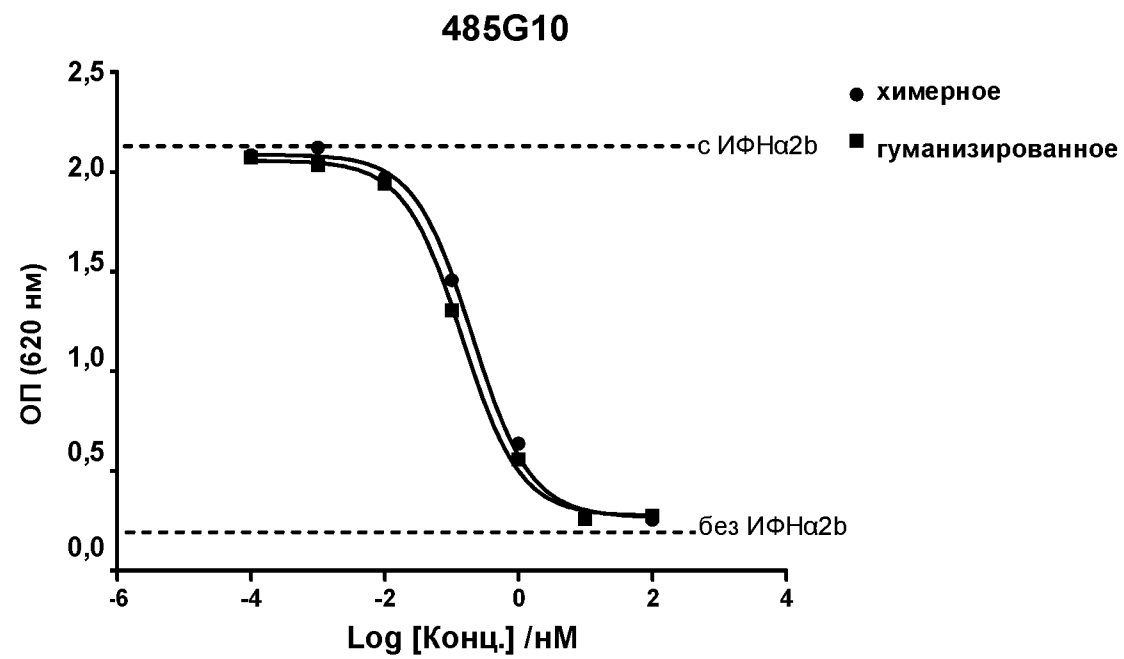
25

36. Способ детектирования экспрессии белка субъединицы 1 рецептора альфа- и бета-интерферона человека (IFNAR1) в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом или его фрагментом по любому из пп. 1-21, и детектирование связывания, которое указывает на экспрессию IFNAR1 в образце.

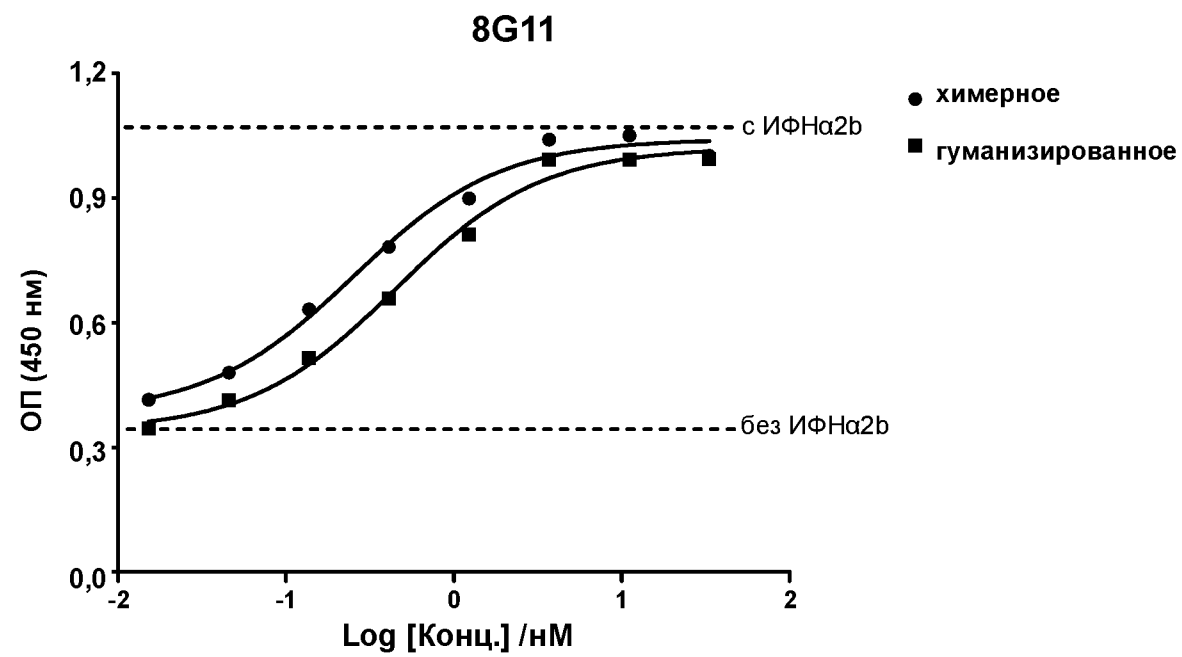


	химерное	гуманизиров.
EC50	0,153	0,161

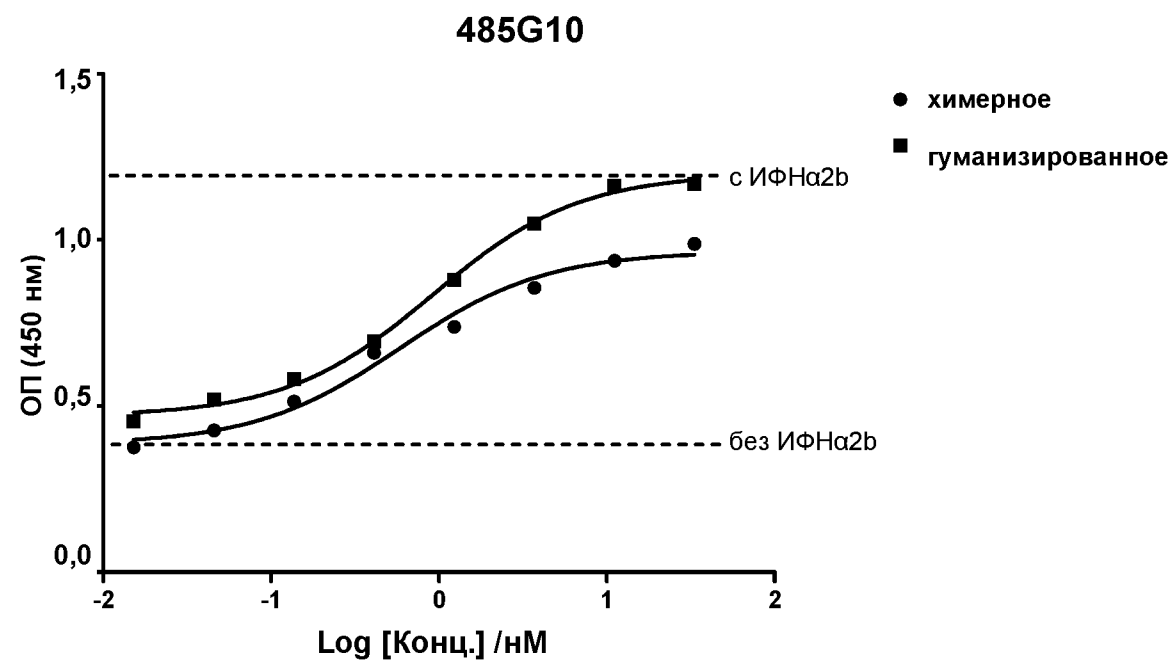
ФИГ. 1А



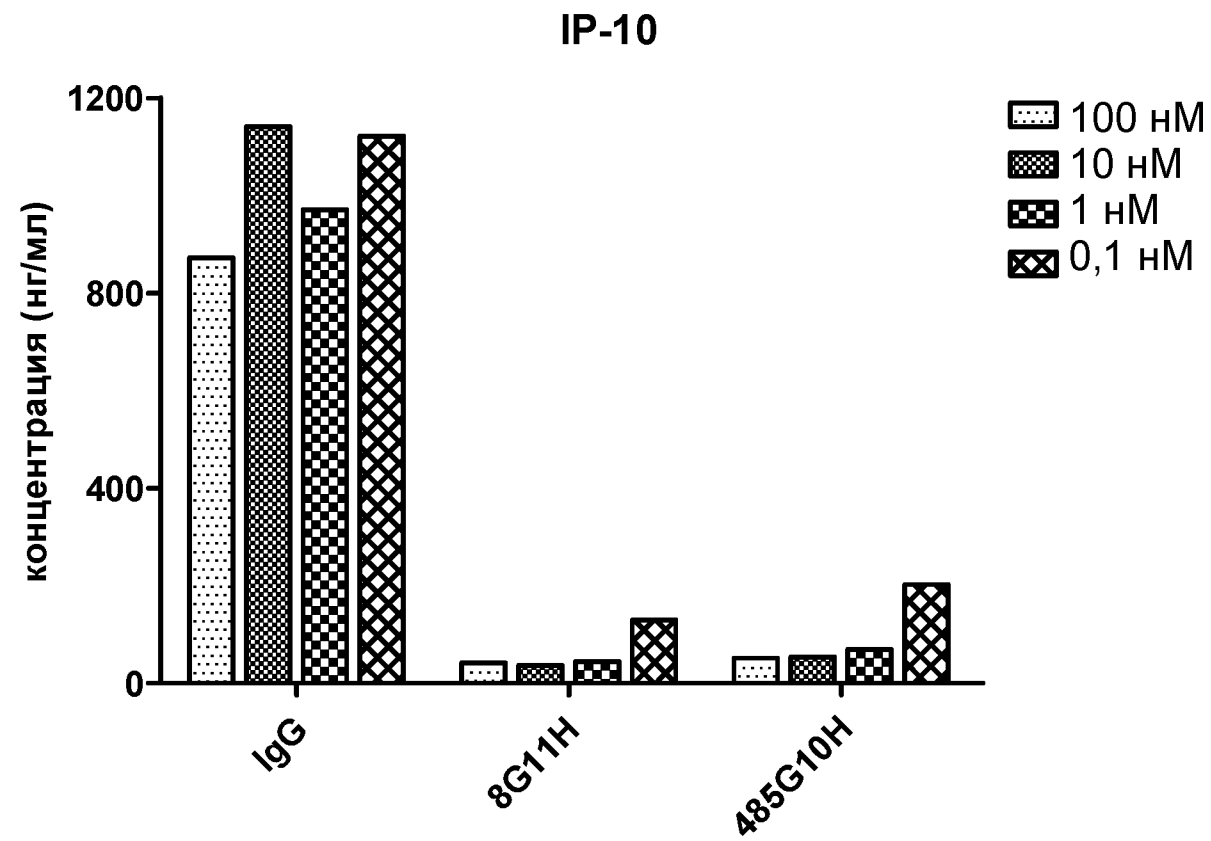
ФИГ. 1В



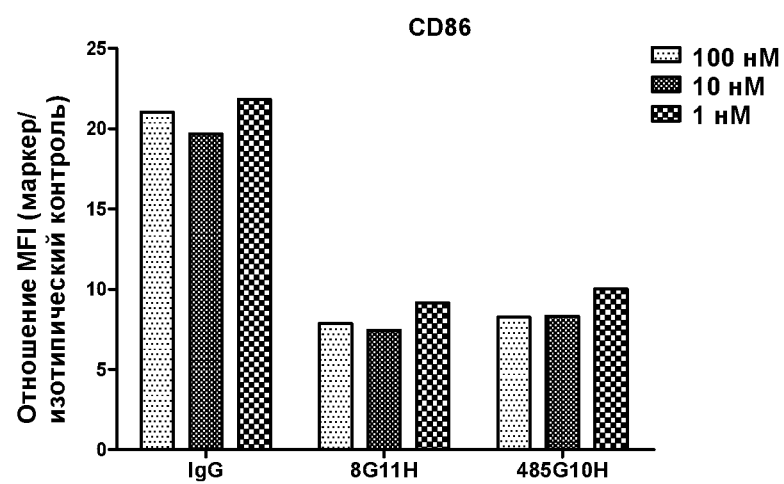
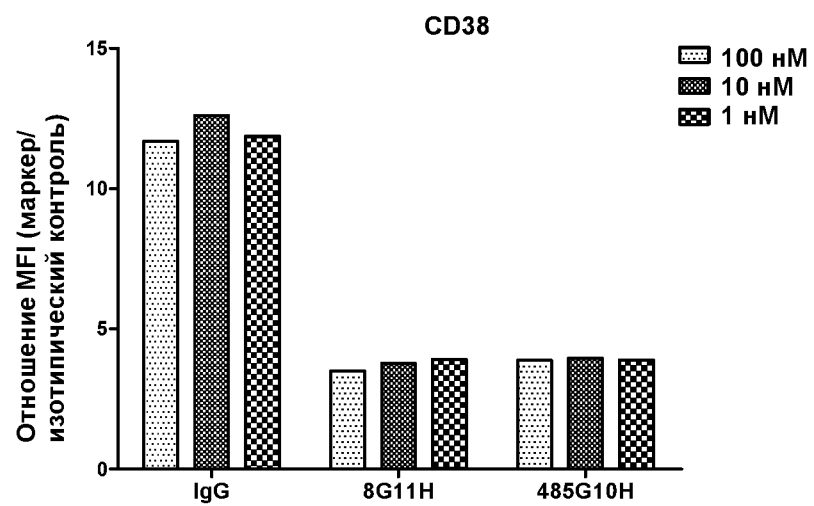
ФИГ. 2А



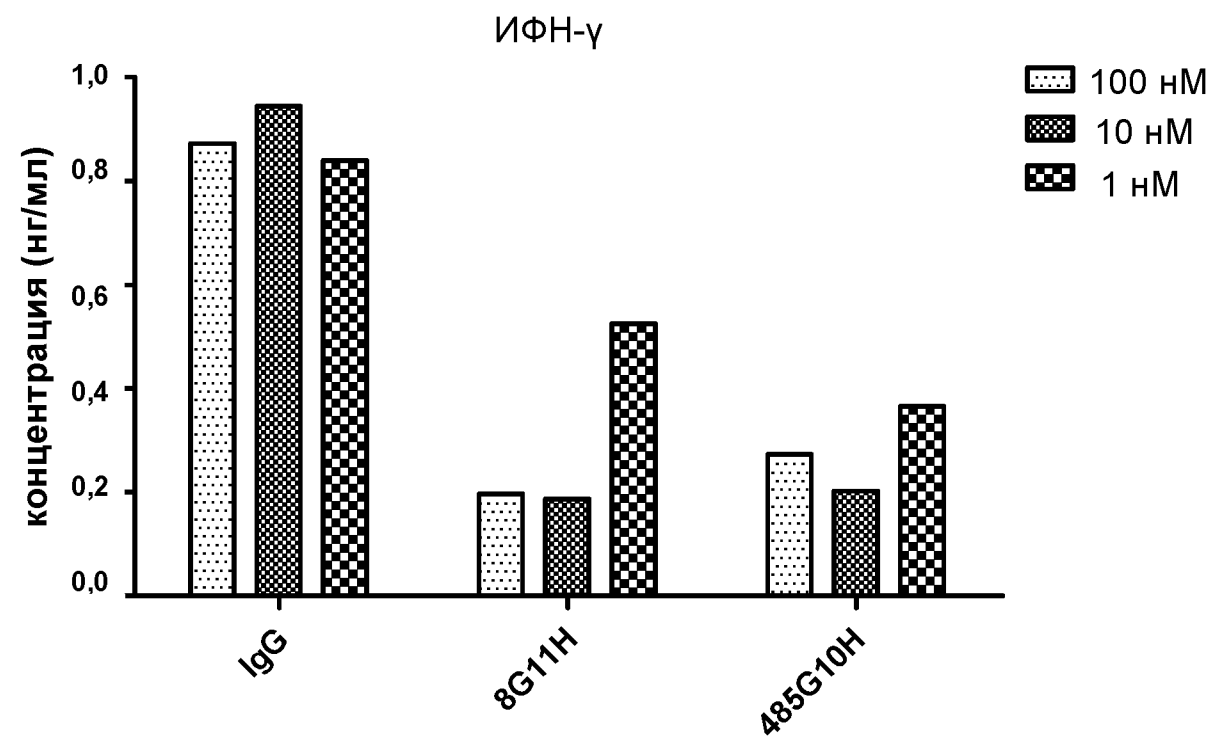
ФИГ. 2В



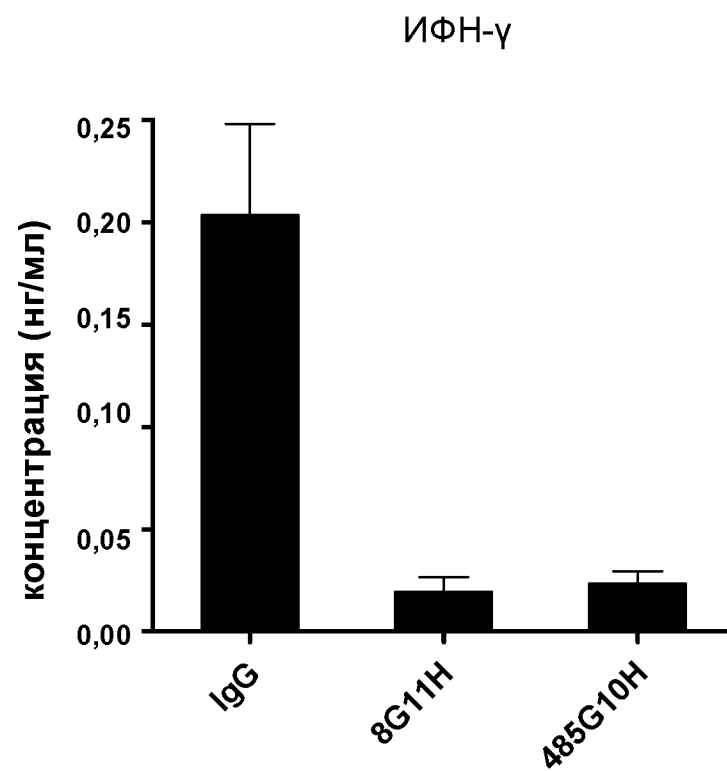
ФИГ. 3



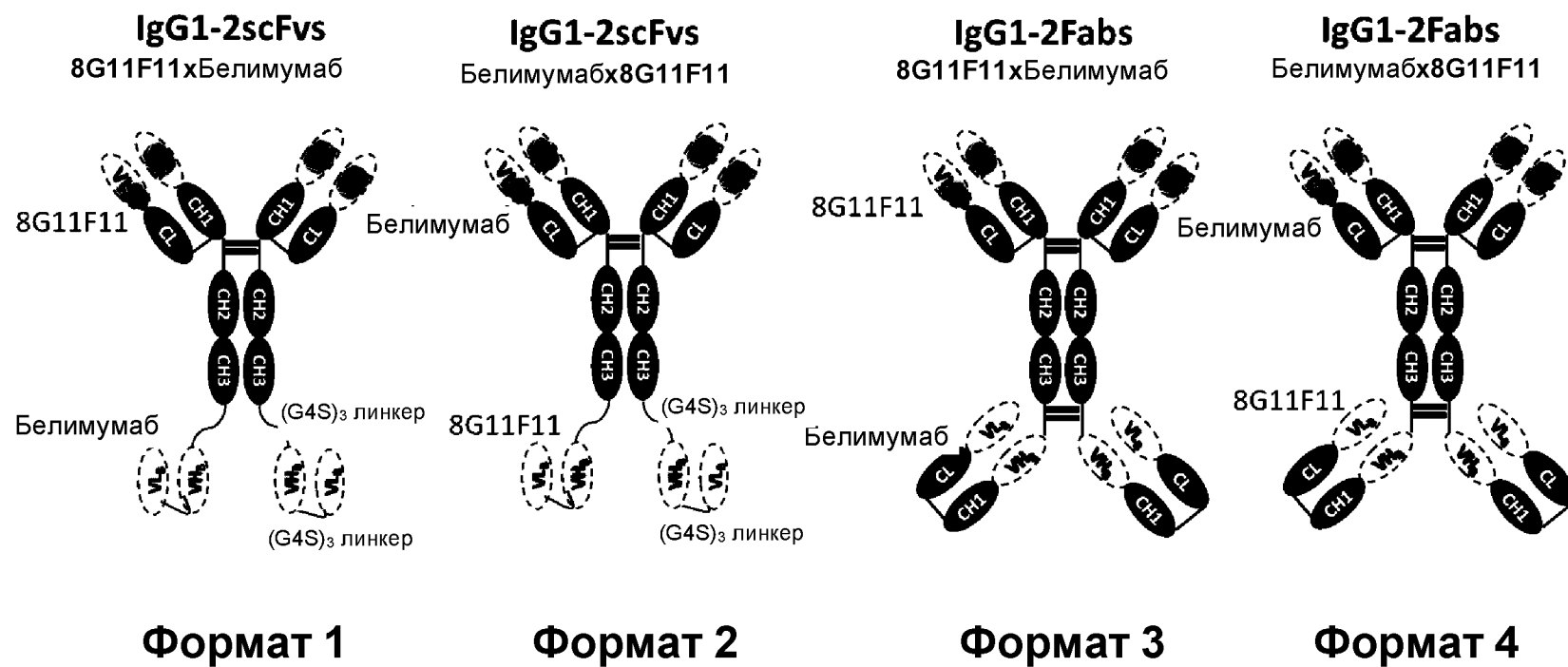
ФИГ. 4



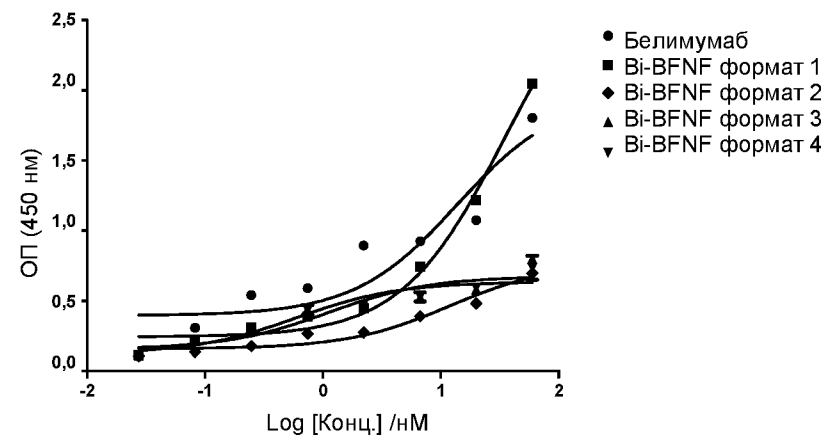
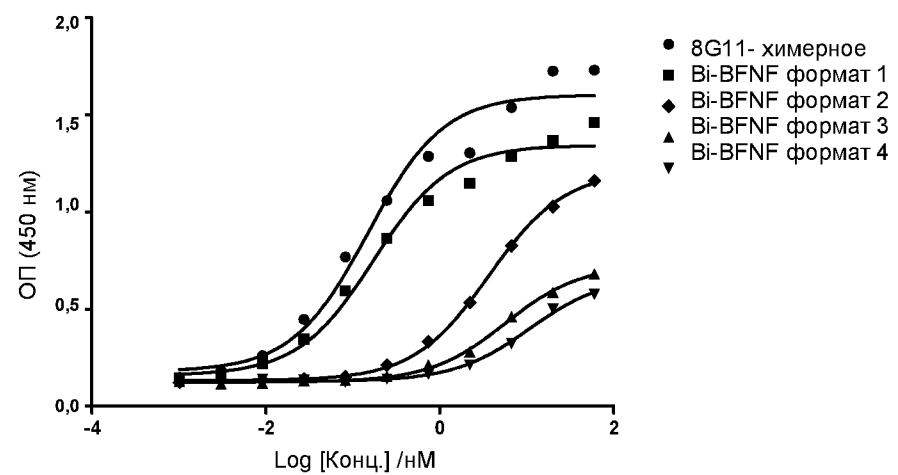
ФИГ. 5



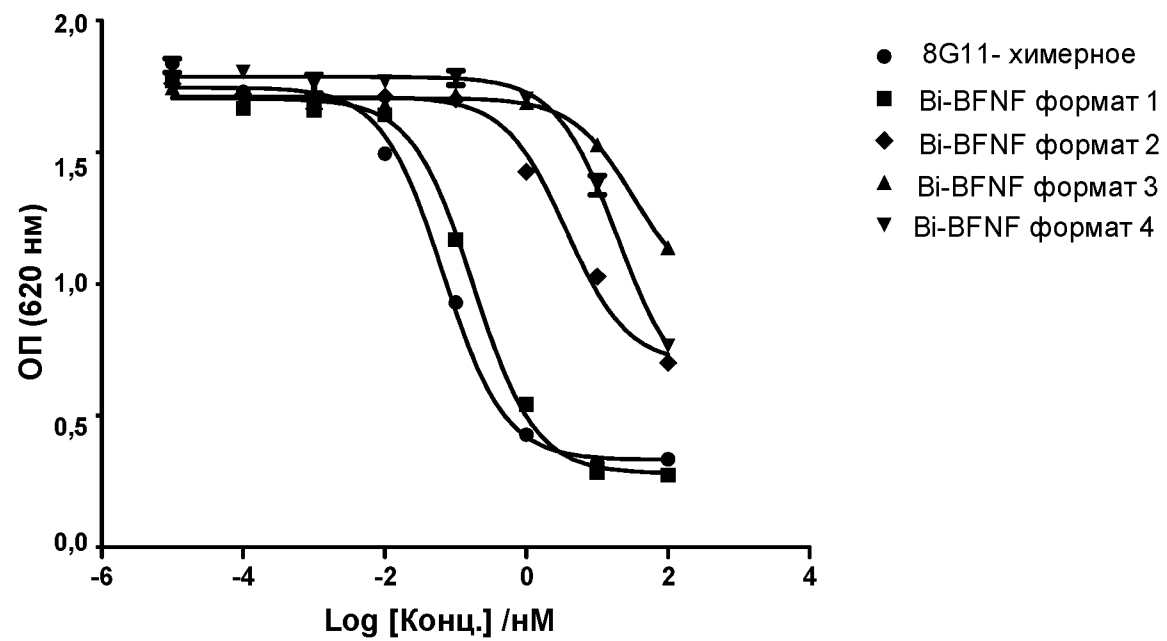
ФИГ. 6



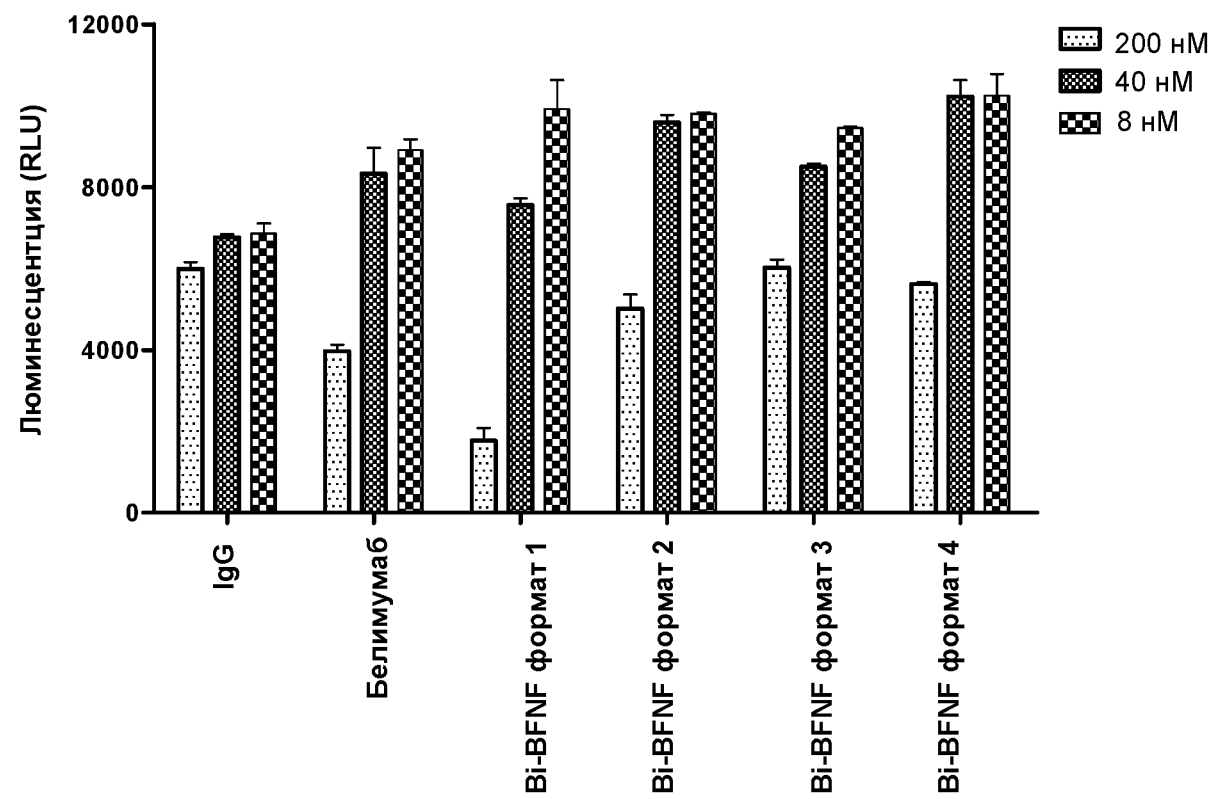
ФИГ. 7



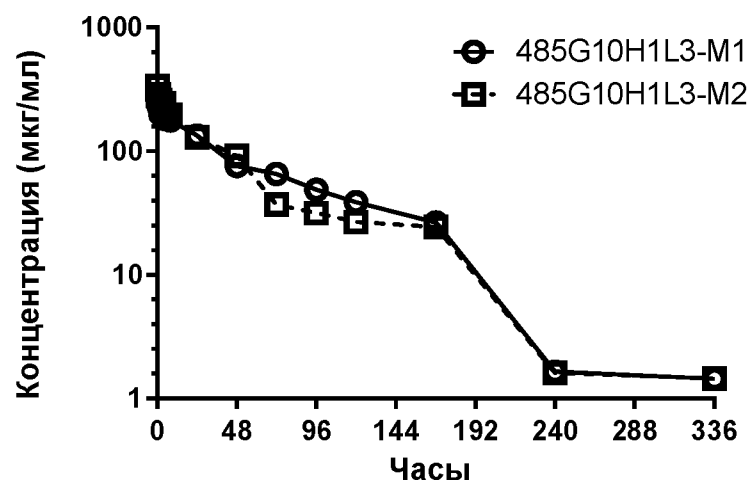
ФИГ. 8



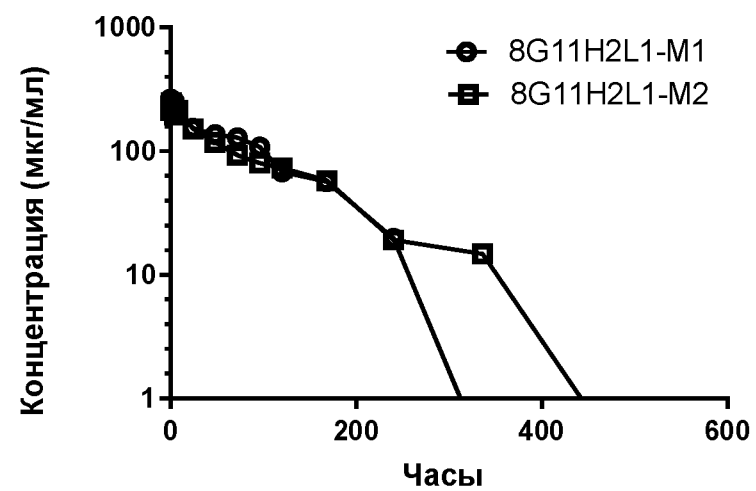
ФИГ. 9А



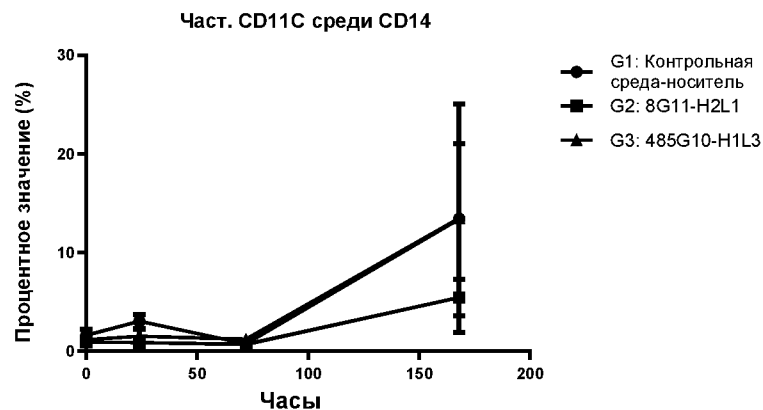
ФИГ. 9В



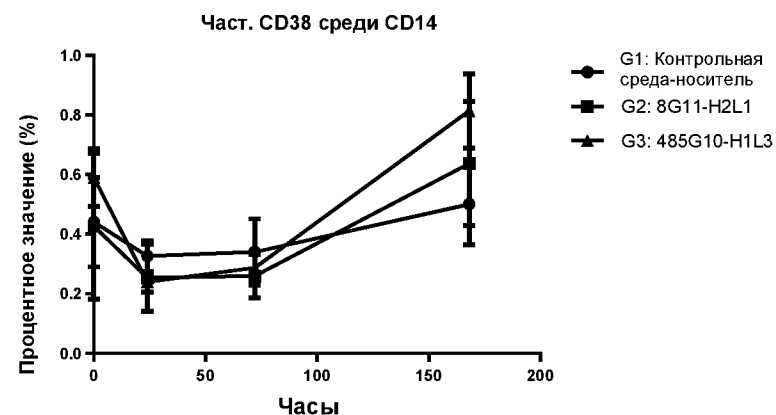
ФИГ. 10А



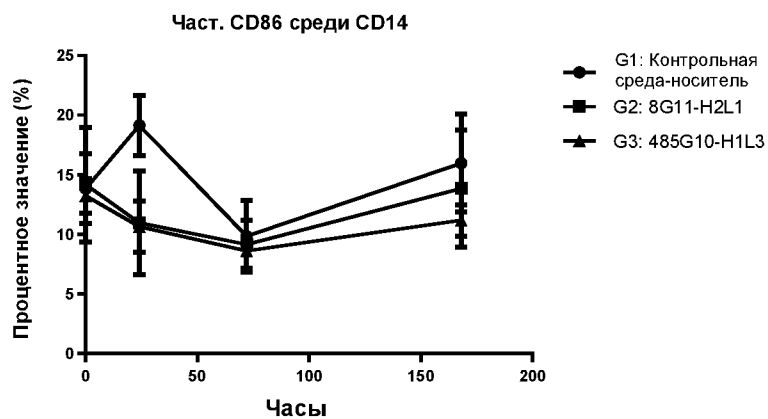
ФИГ. 10В



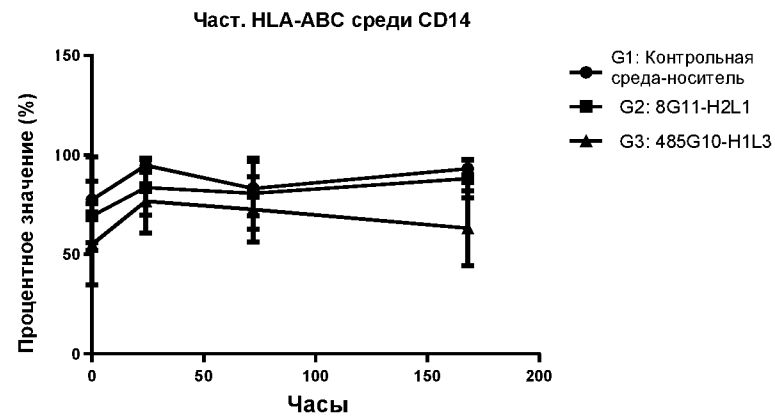
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с G1: среда-носитель (однофакторный дисперсионный анализ/Бонферрони)



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с G1: среда-носитель (однофакторный дисперсионный анализ/Бонферрони)

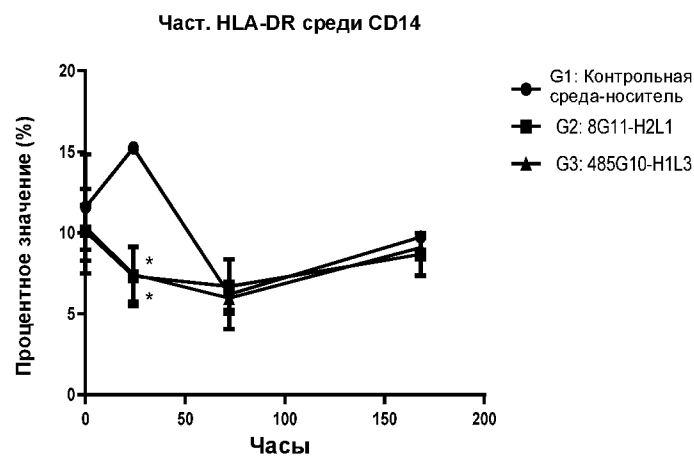


* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с G1: среда-носитель (однофакторный дисперсионный анализ/Бонферрони)

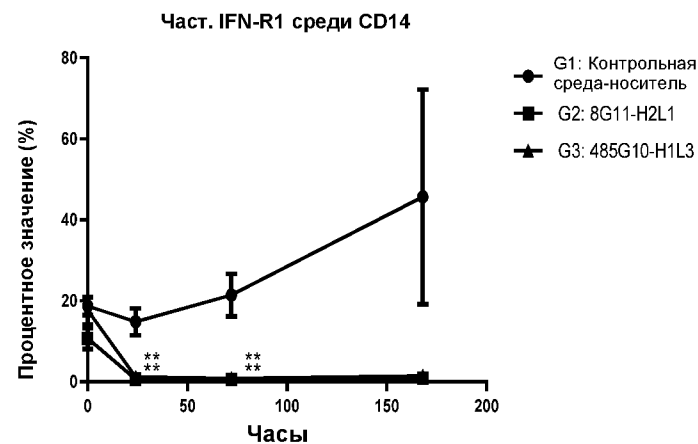


* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с G1: среда-носитель (однофакторный дисперсионный анализ/Бонферрони)

ФИГ. 11А

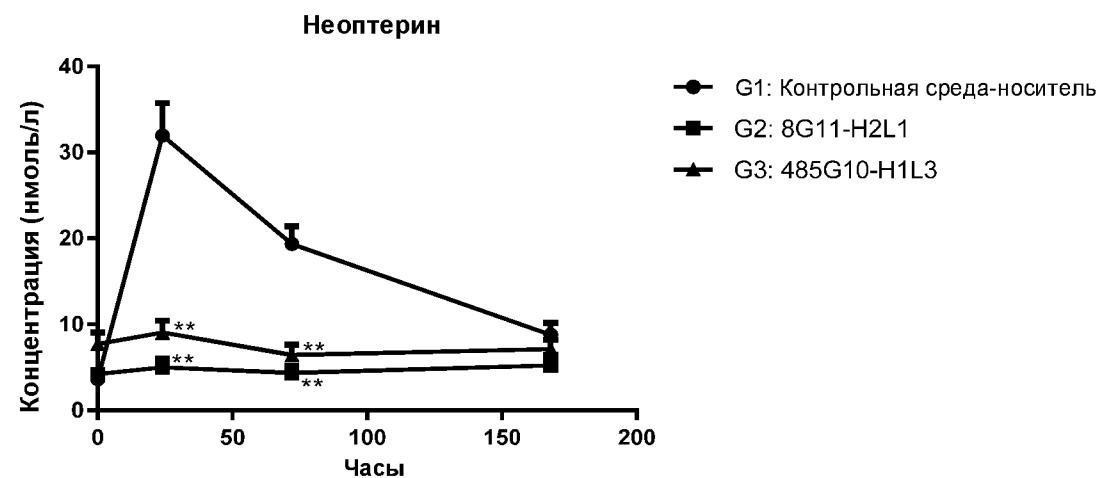


* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с G1: среда-носитель (однофакторный дисперсионный анализ/Бонферрони)

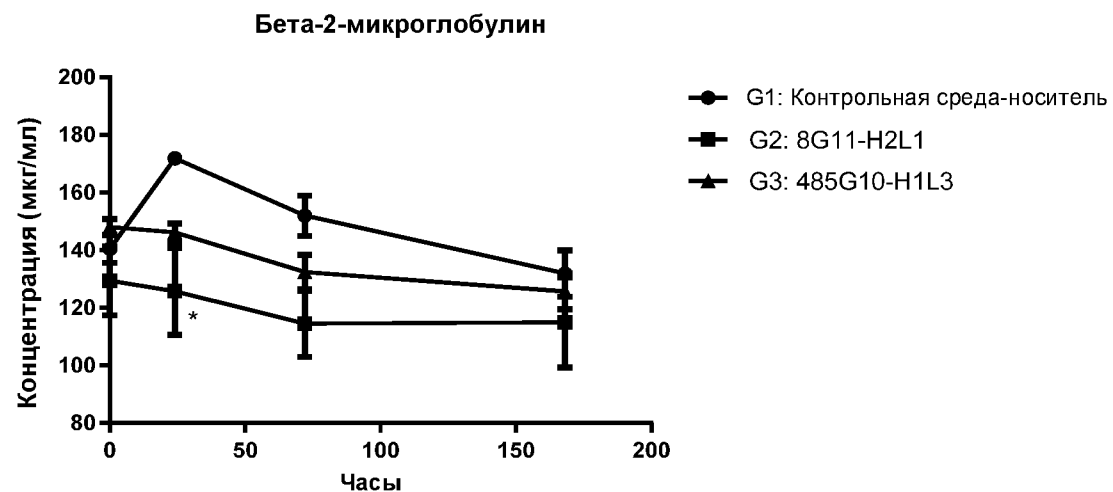


* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с G1: среда-носитель (однофакторный дисперсионный анализ/Бонферрони)

ФИГ. 11А (продолж.)

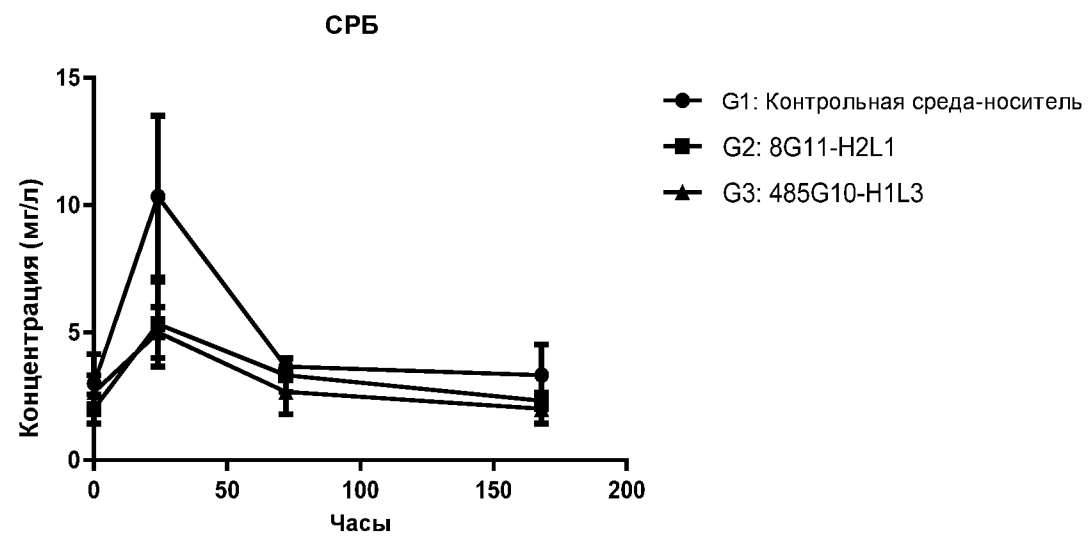


* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с G1: среда-носитель (однофакторный дисперсионный анализ/Бонферрони)



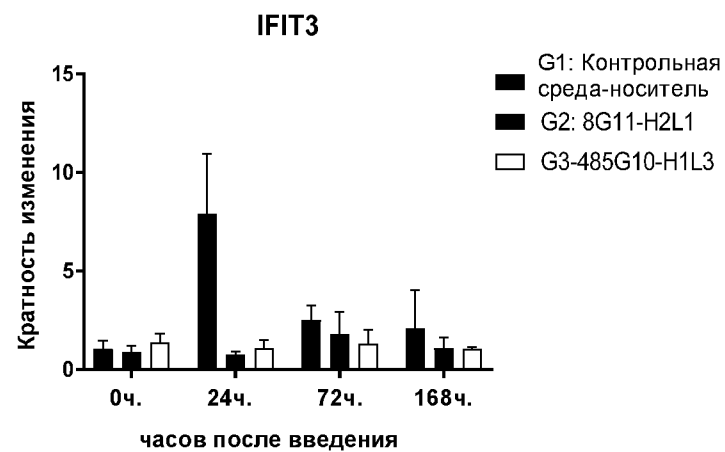
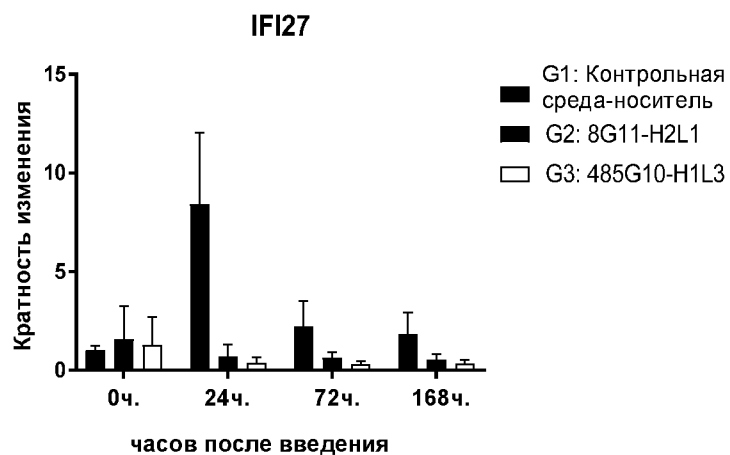
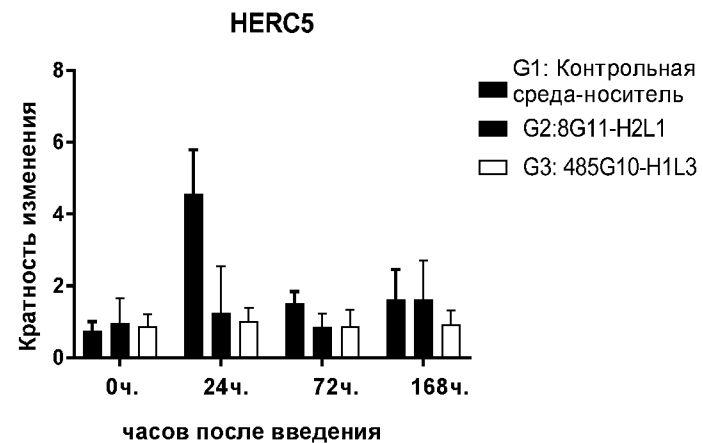
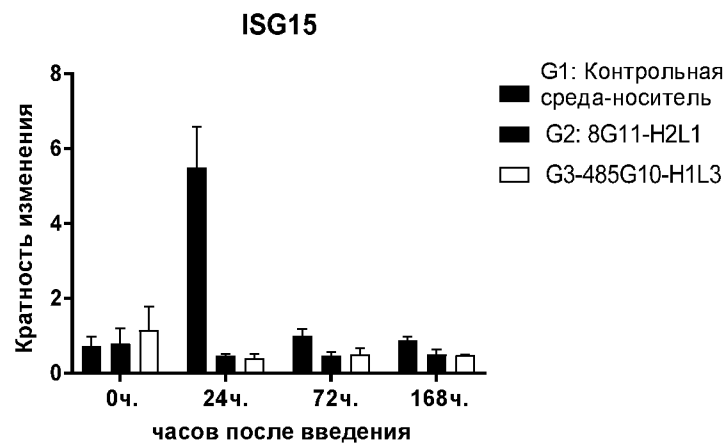
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с G1: среда-носитель (однофакторный дисперсионный анализ/Бонферрони)

ФИГ. 11В



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с G1: среда-носитель (однофакторный дисперсионный анализ/Бонферрони)

ФИГ. 11В (продолж.)



ФИГ. 11С