(19) UA (11) 76 396 (13) C2

(51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 98116315, 29.04.1997

(24) Дата начала действия патента: 15.08.2006

(30) Приоритет: 01.05.1996 IL 118096

(46) Дата публикации: 15.08.2006C07K 16/28
20060101AFI20060420VHUA A61K
39/395 20060101CLI20060420VHUA
A61P 3/00
20060101CLI20060426VHUA A61P
37/00 20060101CLI20060426VHUA
C12N 5/20
20060101CLI20060426VHUA C12N
15/13 20060101CLI20060426VHUA
G01N 33/577
20060101CLI20060426VHUA G01N
33/573 20060101CLI20060426VHUA

(86) Заявка PCT:
PCT/IL97/00138, 19970429

(72) Изобретатель:
Новик Даниэла, IL,
Рубинштейн Менахем, IL

(73) Патентовладелец:
ИЕДА РИСЕРЧ ЭНД ДИВЕЛОПМЕНТ КО. ЛТД, IL

UA 76396 C2

(54) МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, КОТОРОЕ СПОСОБНО СВЯЗЫВАТЬСЯ С РЕЦЕПТОРОМ IFN - , БЛОКИРОВАТЬ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ IFN - И IFN - И ОБРАЗОВЫВАТЬ БОЛЕЕ ВЫСОКИЙ АНТИВИРУСНЫЙ БЛОКИРУЮЩИЙ ТИТР ПРОТИВ INF - , ЧЕМ ПРОТИВ IFN- (ВАРИАНТЫ), ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ МОДУЛИРОВАНИЯ И БЛОКИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ IFN- , ГИБРИДОМА, КОТОРАЯ ЭКСПРЕССИРУЕТ УКАЗАННОЕ АНТИТЕЛО (ВАРИАНТЫ), И НАБОР ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ELISA-АНАЛИЗА IFNAB-BPI И/ИЛИ IFNAB -BPII

(57) Реферат:

Изобретение относится к моноклональному антителу, которое способно связываться с рецептором IFN - α/β , блокировать биологическую активность IFN- α и IFN- β и создавать более высокий антивирусный блокирующий титр против FN- α , чем против IFN- β . Изобретение также относится к гуманизированному антителу, которое содержит вариабельные домены данного моноклонального антитела и константный домен иммуноглобулина человека, фармацевтической композиции для модуляции или блокировки биологической активности IFN- α , гибридом, которые продуцируют отмеченные моноклональные антитела, и набору для проведения ELISA-анализа IFNAB-BPI и/или IFNAB-BPI. Вышеупомянутые фармацевтические композиции предназначены для лечения аутоимунных заболеваний, других воспалительных состояний в организме млекопитающих, лечения токсичных состояний, которые возникают в результате введения интерферона- α или интерферону- β , подросткового диабета, ВИЧ-инфекции и тому подобное.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2006, N 8, 15.08.2006. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

UA 76396 C2

(19) **UA** (11) **76 396** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL PROPERTY

(12) DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION

(21), (22) Application: 98116315, 29.04.1997

(24) Effective date for property rights: 15.08.2006

(30) Priority: 01.05.1996 IL 118096

(46) Publication date: 15.08.2006C07K 16/28
20060101AFI20060420VHUA A61K
39/395 20060101CLI20060420VHUA
A61P 3/00
20060101CLI20060426VHUA A61P
37/00 20060101CLI20060426VHUA
C12N 5/20
20060101CLI20060426VHUA C12N
15/13 20060101CLI20060426VHUA
G01N 33/577
20060101CLI20060426VHUA G01N
33/573 20060101CLI20060426VHUA

(86) PCT application:
PCT/IL97/00138, 19970429

(72) Inventor:
Novick Daniela, IL,
Rubinshtein Menachem, IL

(73) Proprietor:
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD, IL

UA 76396 C2

(54) monoclonal antibody, which is able to be bound with receptor IFN - , block the biological activity of IFN- and IFN- and create higher antiviral titer against FN- , than against IFN- (variants), pharmaceutical composition for modulation or blocking biological activity of IFN- , hybridoma expressing denoted antibody (variants), and set for carrying out ELISA-analysis of IFNAB-BPI and/or IFNAB-BPI

(57) Abstract:

The invention relates to monoclonal antibody, which is able to be bound with receptor IFN - α/β , block the biological activity of IFN- α and IFN- β and create higher antiviral titer against FN- α , than against IFN- β . The invention also relates to humanized antibody, which contains variable domains of this monoclonal antibody and constant domain of human immunoglobulin, pharmaceutical composition for modulation or blocking biological activity of IFN- α , hybridomae, which produce denoted monoclonal antibodies,and set for carrying out ELISA-analysis of IFNAB-BPI and/or IFNAB-BPI. The above mentioned pharmaceutical compositions are designed for the treatment of autoimmune diseases, other inflammatory states of mammals organism, treatment of toxic states, which are caused due to incorporation of interferon - α or interferon - β , adolescent diabetes, HIV-infection and so on.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2006, N 8, 15.08.2006. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

UA 76396 C2

(19) **UA** (11) **76 396** (13) **C2**

(51)МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
98116315, 29.04.1997

(24) Дата набуття чинності: 15.08.2006

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 01.05.1996 IL 118096

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 15.08.2006C07K 16/28
20060101AFI20060420VHUA A61K
39/395 20060101CLI20060420VHUA
A61P 3/00
20060101CLI20060426VHUA A61P
37/00 20060101CLI20060426VHUA
C12N 5/20
20060101CLI20060426VHUA C12N
15/13 20060101CLI20060426VHUA
G01N 33/577
20060101CLI20060426VHUA G01N
33/573 20060101CLI20060426VHUA

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору PCT:
PCT/IL97/00138, 19970429

(72) Винахідник(и):
Новік Даніела , IL,
Рубінштейн Менахем , IL

(73) Власник(и):
ЙЄДА РІСЕРЧ ЕНД ДІВЕЛОПМЕНТ КО. ЛТД, IL

UA 76396 C2

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО, ЩО ЗДАТНЕ ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З РЕЦЕПТОРОМ INFα/β, БЛОКУВАТИ БІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ INF-α І INF-β ТА СТВОРЮВАТИ БІЛЬШ ВИСОКИЙ АНТИВІРУСНИЙ БЛОКУЮЧИЙ ТИТР ПРОТИ INF-α , НІЖ ПРОТИ INF-β (ВАРІАНТИ), ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ МОДУЛЮВАННЯ ТА БЛОКУВАННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ INF-α, ГІБРИДОМА, ЯКА ЕКСПРЕСУЄ ЗАЗНАЧЕНЕ АНТИТІЛО (ВАРІАНТИ), ТА НАБІР ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ELISA-АНАЛІЗУ IFNAB-BPI І/АБО IFNAB-BPII

(57) Реферат:

Винахід належить до моноклонального антитіла, яке здатне зв'язуватися з рецептором IFN - α/β , блокувати біологічну активність IFN- α і IFN- β та створювати більш високий антивірусний блокуючий титр проти IFN- α , ніж проти IFN- β . Винахід також належить до гуманізованого антитіла, що містить варіабельні домени даного моноклонального антитіла та константний домен імуноглобуліну людини, фармацевтичної композиції для модулювання або блокування біологічної активності IFN- α , гібридом, що продукують зазначені моноклональні антитіла, та набору для проведення ELISA-аналізу IFNAB-BPI і/або IFNAB-BPI. Вищезазначені фармацевтичні композиції призначені для лікування аутоімунних захворювань, інших запальних станів в організмі ссавців, лікування токсичних станів, які виникають внаслідок введення інтерферону- α або інтерферону- β , підліткового діабету, ВІЛ-інфекції тощо.

UA 76396 C2

Опис винаходу

Настоящее изобретение относится к антителам против лиганд-связывающего компонента рецептора интерферона-α/β, которые способны избирательно модулировать активность различных интерферонов I типа.

В публикации ЕР №588177 описан растворимый рецептор IFN-α, обладающий молекулярной массой приблизительно 40000, который был идентифицирован путем поперечного сшивания с ^{125}I-IFN-α2 и иммунопреципитации с анти-IFN-α моноклональными антителами. Будучи получено из сыворотки, данное вещество обладало молекулярной массой 50кДа. В ней также описан указанный выше IFN-α-связывающий белок массой 40000Да (здесь далее "IFNAB-BP" или "IFNAB-BPII"), полученный из мочи в гомогенном состоянии и обладающий последовательностью, которая отлична от таковой любого другого известного белка. IFNAB-BP связывается с и блокирует активность множества подтипов IFN-α, равно как и IFN-β.

В публикации ЕР №676413 описаны клонирование и секвенирование двух молекул кДНК, кодирующих предшественники IFNAB-BP. Обе молекулы, возможно, являются продуктами одного гена, например, в результате альтернативного сплайсинга. Также описана продукция двух рекомбинантных белков, обозначаемых как IFNAB-BPI и IFNAB-BPII, в клетках млекопитающих и других организмов-хозяев. Также описаны поликлональные и моноклональные антитела против IFNAB-BP и применимые для блокирования рецептора IFN для иммунологических анализов и иммунологической очистки IFNAB-BPI и IFNAB-BPII.

В настоящем изобретении описаны две группы нейтрализующих антител, индуцированных против IFNAB-BPII, которые связываются с рецептором интерферона I типа на человеческих клетках, Антитела одной группы способны блокировать активность различных подтипов интерферона-α в человеческих клетках без влияния на активность интерферона- β. Таким образом, указанные антитела одной группы способны ингибировать нежелательные эффекты IFN-α при очень небольшом воздействии на активность IFN-β.

Предпосылки изобретения.

Интерфероны I типа (IFN) (IFN-α, IFN-β и IFN-ω) составляют семейство структурно родственных цитокинов, обычно определяемых по их способности обеспечивать сопротивляемость вирусным инфекциям. Сообщалось о множестве других биологических активностей IFN I типа, включая ингибирование клеточной пролиферации, индукции антигенов MHC I класса и некоторые другие иммунорегуляторные активности (1). IFN- α и IFN-β являются применимыми для лечения некоторых вирусных заболеваний, включая гепатит С (2, 3) и обыкновенных бородавок (4, 5), равно как и определенных злокачественных опухолей, таких как лейкозный ретикулоэндотелиоз (6), хронический миелолейкоз (7) и саркома Капоши (8).

IFN-α определяли в образцах сыворотки различных пациентов, страдающих аутоиммунными заболеваниями, такими как системная красная волчанка (9), равно как и пациентов, страдающих ВИЧ-инфекцией (10). IFN-α вовлечен в процесс развития юношеского диабета (11). Далее, было показано, что в некоторых случаях терапия при помощи IFN- α приводит к нежелательным побочным эффектам, включая лихорадку и неврологические расстройства (12). Следовательно, существуют патологические состояния, при которых нейтрализация активности IFN-α может являться желательной для пациента.

Как и в случае других цитокинов, IFN-α оказывает свои биологические эффекты посредством связывания с рецептором на поверхности клетки, который является специфичным для всех подтипов IFN-α, равно как и IFN-β (13). Человеческий рецептор IFN-α (IFNAR) идентифицировали и клонировали на клетках Daudi (14). Клонированный рецептор состоит из одного трансмембранного домена, внеклеточного и внутриклеточного доменов. Будучи экспрессирован на мышиных клетках, данный рецептор определяет реактивность по отношению к человеческому IFN-αB, но не значительно определяет реактивность по отношению к другим видам IFN-α и IFN-β, указывая на то, что в формирование ответа на IFN-β и на различные виды IFN-α могут быть вовлечены дополнительные компоненты.

Некоторые другие исследования указывают на то, что в процесс связывания IFN- α и IFN-β вовлечены дополнительные компоненты или субъединицы рецептора (15-17). Однако, сообщалось, что в процесс связывания всех видов IFN-α и IFN-β (18) вовлечен ранее описанный рецептор (14). Действительно, недавно был идентифицирован и клонирован второй рецепторный компонент, так называемый рецептор IFN-α/β (публикация ЕР №676413 и ссылка 19). Авторами настоящей заявки было продемонстрировано, что рецептор IFN-α/β, внеклеточный домен которого обладает той же последовательностью, что и IFNAB-BPI, представляет собой основной лиганд-связывающий компонент рецептора интерферона I типа. Более того, рецептор интерферона-α/β и IFNAR проявляют кооперативность связывания лиганда и образуют тройной комплекс с интерферонами I типа на клеточной поверхности (20).

Моноклональные антитела, направленные против IFNAR и способные блокировать активность интерферонов I типа неизбирательным образом были описаны ранее (21). Было описано другое моноклональное антитело против неидентифицированного рецеторного компонента. Данное антитело блокировало активность интерферонов I типа неизбирательным образом (22).

Настоящее изобретение обеспечивает моноклональные антитела против рецептора IFN- α/β, который представляет собой обычный рецептор IFN-α и IFN-β. Данные антитела связываются с некоторыми формами рецептора, которые либо экспрессируются на человеческих клетках, либо существуют в виде растворимых форм IFNAB-BPI и IFNAB-BPII. Были выработаны два типа нейтрализующих моноклональных антител. Высокий титр антител одного типа наблюдается при применении для блокирования противовирусной активности как

UA 76396 C2

UA 76396 C2

IFN-α, так и IFN-β. Высокий блокирующий титр антител второго типа неожиданно наблюдается только в связи с противовирусной активностью IFN-α при очень низком титре, связанном с активностью IFN-β. Таким образом, неожиданный второй тип моноклональных антител может быть применен в определенном интервале концентраций для избирательного блокирования активности IFN-α, тогда как активность IFN-β изменяться не будет.

Настоящее изобретение также обеспечивает гуманизированные моноклональные антитела против рецептора IFN-α/β, экспрессированного на человеческих клетках, IFNAB-BPI и IFNAB-BPII. Гуманизированные моноклональные антитела представляют собой гибридные молекулы мышиных и человеческих антител, в которых вариабельные домены происходят из мышиных антител, тогда как постоянные домены происходят из человеческих антител.

Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы ДНК, кодирующие моноклональные антитела и гуманизированные моноклональные антитела против рецептора IFN-α/β, IFNAB-BPI и IFNFB-BPII.

Данное изобретение далее обеспечивает реплицируемые экспрессирующие векторы, содержащие указанные молекулы ДНК, трансформированные ими организмы-хозяева и белки, продуцируемые такими трансформированными организмами-хозяевами. Термин "молекулы ДНК" включает в себя геномную ДНК, кДНК, синтетическую ДНК и их комбинации.

Данное изобретение также относится к молекулам ДНК, которые гибридизуются в строго определенных условиях с указанными выше молекулами ДНК и кодируют последовательность белков, обладающих такой же биологической активностью, что и моноклональные антитела и гуманизированные моноклональные антитела против рецептора IFN-α/β, IFNAB-BPI и IFNAB-BPII.

Настоящее изобретение также обеспечивает способы получения клеток-хозяев, способных продуцировать функциональные моноклональные антитела и гуманизированные моноклональные антитела против рецептора IFN-α/β, IFNAB-BPI и IFNAB-BPII.

Моноклональные антитела по настоящему изобретению ингибируют биологическую активность человеческого интерферона-α в человеческих клетках без воздействия на биологическую активность человеческого интерферона-β. Биологическую активность определяли путем количественной оценки ингибирующего эффекта антитела при тестировании методом анализа ингибирования цитопатического эффекта с применением человеческих клеток WISH и вируса везикулярного стоматита.

В соответствии с заявкой на патент Израиля №106591, IFN-α/β-связывающий белок, обладающий молекулярной массой 40000кДа, (IFNAB-BP) выделяли из обычной мочи в две хроматографические стадии. Неочищенные белки мочи наносили на колонку, состоящую из IFN-α2, пришитого к агарозе. Колонку промывали в целях удаления неинтересующих белков, а связанные белки затем смывали при низких значениях pH. Смытые белки затем разрешали с помощью ЖХВР с разделением по размеру (размероспецифичной ЖХВР) с выходом нескольких белковых фракций, одна из которых характеризовалась своей способностью специфично взаимодействовать с ^{125}I-IFN-α2 и блокировать противовирусную активность IFN-α и IFN-β. Данный белок был далее охарактеризован с помощью анализа N-концевой микропоследовательности. Полученную последовательность сравнили с и нашли отличной от таковой известного рецептора IFNAR (14). Она также отличалась от таковой любого другого известного белка, и она не кодировалась ни одной из известных последовательностей ДНК, что определяли путем ее сравнения с вводами банков, данных Swissprot и Genebaiik с применением программы FastA (23).

Гомогенные препараты IFNAB-BP, выделенного из мочи, применяли в качестве иммуногена для получения антител.

Подразумевается, что термин "антитело" включает в себя поликлональные антитела, моноклональные антитела (МАТ), химерные антитела, антиидиотипические (анти-Id) антитела к антителам, которые могут быть помечены в растворимой или связанной формах, равно как и их активные участки, полученные в соответствии с любой известной методикой, такой как, но не ограничиваясь, ферментативное расщепление, пептидный синтез или рекомбинантные методики.

Поликлональные антитела представляют собой гетерогенные популяции молекул антител, полученные из сыворотки животных, иммунизированных антигеном. Моноклональное антитело содержит, по существу, гомогенную популяцию антител, специфичных к антигенам, причем данная популяция содержит, по существу, идентичные эпитопсвязывающие сайты. МАТ могут быть получены в соответствии с методиками, известными специалистам в данной области. [Смотри, например, Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Патент США №4376110; Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1987-1996); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); и Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992-1996), причем содержание данных ссылок приводится здесь целиком в качестве ссылки]. Такие антитела могут являться иммуноглобулинами любого класса, включая IgG, IgM, IgE, IgA, GILD и любой их подкласс. Гибридома, продуцирующая МАТ по настоящему изобретению, может быть выращена in vitro, in situ или in vivo. Продукция более высоких титров МАТ in vivo или in situ делает данные методики предпочтительным в настоящее время способом продукции.

Химерные антитела представляют собой молекулы, различные части которых происходят от животных разных видов, как, например, молекулы, содержащие вариабельный участок, происходящий из мышиного МАТ, и постоянный участок человеческого иммуноглобулина. Химерные антитела исходно применяли для снижения иммуногенности в применении и для повышения объема продукции, например, если мышиные МАТ

UA 76396 C2

продуцируются гибридомами с более высоким выходом, но с более высокой иммуногенностью у людей, такие как человеческие/мышиные, применяют химерные МАТ. Химерные антитела и способы их продукции известны в данной области [Cabilly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277 (1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al., Nature 312:643-646 (1984); Cabilly et al., заявка на Европейский патент 125023 (опубликованная 14 ноября 1984 года); Neuberger et al., Nature 314:268-270 (1985); Taniguchi et al., заявка на Европейский патент 171496 (опубликованная 19 февраля 1985 года); Morrison et al., заявка на Европейский патент 173494 (опубликованная 5 марта 1986 года); Neuberger et al., заявка по PCT WO 8601533 (опубликованная 13 марта 1986 года); Kudo et al., заявка на Европейский патент 184187 (опубликованная 11 июня 1986 года); Morrison et al., заявка на Европейский патент 173494 (опубликованная 5 марта 1986 года); Sahagan et al., J. Immunol. 137:1066-1074 (1986); Robinson et al., публикация Международного патента, WO 9702671 (опубликованная 7 мая 1987 года); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218 (1987); Better et al., Science 240:1041-1043 (1988); и Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, supra]. Данные ссылки включены сюда целиком в качестве ссылки.

Антиидиотипическое (анти-Id) антитело представляет собой антитело, которое распознает специфичные детерминанты, как правило, ассоциированные с антигенсвязывающим сайтом антитела. Анти-Id антитело может быть получено путем иммунизации животного одинакового вида и генотипа как источника МАТ (например, линии мышей) МАТ, на которое получают анти-Id. В организме иммунизированного животного будут происходить распознавание и ответ на идиотипические детерминанты иммунизирующего антитела в виде выработки антител на данные идиотипические детерминанты (анти-Id антитело). Смотри, например, патент США №4699880, который включен здесь целиком в качестве ссылки.

Анти-Id антитело может быть также применено в качестве "иммуногена" для индукции иммунного ответа еще в одном животном с получением так называемого анти-анти-Id антитела. Анти-Id антитело может обладать идентичными эпитопами с исходным МАТ, которое индуцировало выработку анти-Id. Таким образом, с помощью применения антител к идиотипическим детерминантам МАТ можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности.

Соответственно, МАТ, выработанные против IFNAB-BPI, IFNAB-BPII и родственных белков по настоящему изобретению, могут быть применены для индукции анти-Id антител в подходящих животных, таких как мыши BALB/c. Спленоциты таких иммунизированных мышей применяют для создания анти-Id гибридом, секретирующих анти-Id МАТ. Далее, анти-Id МАТ могут быть прикреплены к носителю, такому как гемоцианин keyhole limpet (KLH), и применены для иммунизации дополнительных мышей BALB/c. Сыворотка данных мышей будет содержать анти-Id антитела, которые обладают параметрами связывания исходных МАТ, специфичных к IFNAB-BPI или IFNAB-BPII.

Таким образом, анти-Id МАТ содержат собственные идиотипические эпитопы, или "идиотопы", структурно сходные с эпитопом, подвергающимся оценке, таким как IFNAB-BPI или IFNAB-BPII.

Также подразумевается, что термин "антитело" включает как интактные молекулы, так и их активные участки, такие как, например, Fab и $F(ab')_2$, которые способны связывать антиген. Fab- и $F(ab')_2$-фрагменты не содержат Fc-фрагмента интактного антитела, быстрее выводятся из циркуляции и могут в меньшем объеме осуществлять неспецифическое связывание с тканями по сравнению с ин-тактным антителом [Wahl et al., J.. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)].

Было бы чрезвычайно полезно, если бы Fab- и $F(ab')_2$- и другие фрагменты антител, применимые по настоящему изобретению, могли быть применены для избирательного блокирования биологической активности IFN-α в соответствии с методиками, описанными здесь для интактных молекул антител. Такие фрагменты обычно получают путем протеолитического расщепления, применяя ферменты, такие как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения $F(ab')_2$-фрагментов).

Об антителе говорят, что оно "способно связывать" молекулу, если оно способно специфично взаимодействовать с молекулой, посредством чего молекула связывается с антителом. Подразумевается, что термин "эпитоп" относится к той части любой молекулы, способной к связыванию с антителом, которая также может быть распознана данным антителом. Эпитопы или "антигенные детерминанты" обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи Сахаров, и обладают специфичными трехмерными структурными характеристиками, равно как и специфичными зарядовыми характеристиками.

"Антиген" представляет собой молекулу или часть молекулы, способную к связыванию с антителом, которое к тому же способно индуцировать ответ иммунной системы животного в виде продуцирования антитела, способного связываться с эпитопом данного антигена. Антиген может содержать один или несколько эпитопов. Подразумевается, что специфичная реакция, относящаяся к указанному выше, указывает на то, что антиген будет высоко избирательно взаимодействовать с соответствующим ему антителом и не будет взаимодействовать с множеством других антител, выработка которых может быть индуцирована другими антигенами.

Антитела, включая фрагменты антител, применимые по настоящему изобретению, могут быть применены для блокирования биологической активности подтипов IFN-α с оказанием незначительного влияния на активность интеферона-β.

Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы ДНК, кодирующие последовательность любого из антител по настоящему изобретению, которые определены выше, реплицмруемые экспрессирующие векторы, содержащие любые из таких молекул ДНК, клетки-хозяева, трансформированные любыми из таких

UA 76396 C2
UA 76396 C2

экспрессирующих векторов, включая прокариотические и эукариотические клетки-хозяева.

Данное изобретение далее относится к активным мутеинам и активным участкам указанных антител и к гибридным белкам, состоящим из антител дикого типа, или их активных мутеинов или их активных участков, конденсированных с другим полипептидом или белком и проявляющих сходную способность блокировать биологическую активность IFB I типа.

ДНК, кодирующую последовательности указанных антител, их активных участков, мутеинов или гибридных белков, и оперативно пришитые регуляторные сигналы транскрипции и трансляции, вносят в эукариотические векторы, которые способны интегрировать последовательность желаемого гена в хромосому клетки-хозяина. В целях выбора клеток, которые устойчиво интегрируют внесенную ДНК в свои хромосомы, применяют один или несколько маркеров, которые позволяют выбирать клетки-хозяева, которые содержат экспрессирующий вектор. Маркер может обеспечить прототрофность для ауксотрофного хозяина, невосприимчивость к биоцидам, например, к антибиотикам, или невосприимчивость к тяжелым металлам, таким как медь, или тому подобное. Избранный маркерный ген может быть либо непосредственно пришит к последовательностям ДНК генов, подлежащих экспрессии, или введен в ту же клетку по методу котрансфекции. Дополнительные элементы могут также быть необходимыми для оптимального синтеза одноцепочечной мРНК binding protein. Данные элементы могут включать в себя сплайсинг-сигналы, равно как и промоторы, энхансеры транскрипции и сигналы терминации (24).

В целях экспрессии указанных антител, их активных участков или производных молекула ДНК, подлежащая введению в выбранные клетки, предпочтительно, будет включена в плазмиду или вирусный вектор, способный к автономной репликации в хозяине-реципиент.

Представляющие важность факторы в выборе конкретной плазмиды или вирусного вектора включают в себя: простоту, с которой клетки-реципиенты, которые содержат вектор, могут быть распознаны и выделены из тех клеток-реципиентов, которые не содержат вектор; число копий вектора, которое желательно внести в определенного хозяина; и является ли желаемым "переносить" вектор между клетками-хозяевами различных видов. Предпочтительные прокариотические векторы включают плазмиды, такие как реплицируемые в E. coli, например, pBR322, ColE1, pSC101, pACYC 184 и т.д. (25); плазмиды Bacillus, такие как pC194, pC221, pT127 и т.д. (26); плазмиды Streptomyces, включая plJ101 (27), бактериофаги Streptomyces, такие как IC31 (28) и плазмиды Pseudomonas (29, 30).

Предпочтительные эукариотические плазмиды включают BPV, вирус коровьей оспы, SV40, 2-микронное кольцо и т.д. или их производные. Такие плазмиды хорошо известны в данной области (31-35).

Как только вектор или последовательность ДНК, содержащая мотив(ы) подготавливают к экспрессии, экспрессирующий вектор может быть введен в подходящую клетку-хозяин посредством любого из множества методов, таких как трансформация, трансфекция, липофекция, конъюгация, слияние протопластов, электропорирование, кальцийфосфатная преципитация, прямая микроинъекция и т.д.

Клетки-хозяева, применимые по данному изобретению, могут являться либо прокариотическими, либо эукариотическими. Предпочтительные прокариотические хозяева включают бактерии, такие как E. coli, Bacillus, Streptomyces, Pseudomonas, Salmonella, Serratia и т.д. Наиболее предпочтительным прокариотическим хозяином является E. coli. Особенно интересующие бактериальные хозяева включают штамм 294 E. coli K12 (ATCC 31446), E. coli X1776 (ATCC 31537), E. coli W3110 (F-, λ^-, прототрофная (ATCC 27325)) и другие энтеробактерии, такие как Salmonella Typhimurium или Serratia marcescens и различные виды Pseudomonas. В таких условиях белок находится в негликозилированном состоянии. Прокариотический хозяин должен быть совместим с последовательностью репликона и контрольной последовательностью в экспрессирующей плазмиде.

Предпочтительными эукариотическими хозяевами являются клетки млекопитающих, например, человеческие, обезьяньи, мышиные клетки и яйцеклетки китайского хомячка (CHO), поскольку они обеспечивают посттрансляционные модификации белковых молекул, включая адекватное упорядочивание, адекватное образование дисульфидных связей, равно как и гликозилирование по адекватным сайтам. Также посттрансляционные модификации пептидов, включая гликозилирование большим количеством остатков маннозы, могут проводить клетки дрожжей и клетки насекомых. Существует ряд стратегий экспрессии рекомбинантной ДНК, где применяются высокопродуктивные промоторные последовательности и большое количество копий плазмид, которые могут быть применены для получения желаемых белков в дрожжевых клетках и в клетках насекомых. В дрожжевых клетках происходит распознавание лидерных последовательностей клонированных продуктов генов млекопитающего и секреция пептидов, несущих лидерные последовательности. После внесения вектора клетки-хозяева культивируют в селективной среде, которая направляет рост векторсодержащих клеток. Экспрессия клонируемой(ых) последовательности(ей) генов приводит к продукции указанных антител, гибридных белков или мутеинов или их активных участков. Экспрессированные антитела затем выделяют и очищают в соответствии с любой традиционной методикой, включая экстракцию, осаждение, хроматографию, электрофорез и тому подобное, или по методу аффинной хроматографии.

Как здесь используется, термин "мутеины" относится к аналогам указанных антител, в которых один или несколько аминокислотных остатков указанных антител или их активных участков замещены различными аминокислотными остатками или удалены, или один или несколько аминокислотных остатков добавлены к исходной последовательности указанных антител, без существенного изменения активности полученных продуктов по сравнению с антителами дикого типа или их активными участками. Данные мутеины получают в соответствии с известными методиками синтеза и/или сайт-специфического мутагенеза или в соответствии с любой другой методикой, подходящей для данных целей.

UA 76396 C2

Любой такой мутеин обладает последовательностью аминокислот, существенно дублирующей таковую указанных антител с тем, чтобы обладать активностью, по существу, идентичной таковой указанных антител или их активных участков. Одна группа указанных антител способна блокировать противовирусную активность человеческого IFN-α2 и человеческого IFN-β. Другая группа указан-ных антител способна блокировать противовирусную активность человеческого IFN-α2, тогда как активность человеческого IFN-β остается, по большей части, неизменной. Таким образом, с помощью постановки традиционных экспериментов, заключающихся в подвергании такого мутеина, например, обычному анализу противовирусной активности, может быть определено, обладает ли любой данный мутеин той же активностью, что и указанное антитело, поскольку мутеин, который блокирует эффект любого вида интерферона I типа, в достаточной мере сохраняет активность указанных антител и, таким образом, обладает, по крайней мере, одним из описанных применений указанных антител и, таким образом, обладает активностью, по существу, идентичной таковой указанных антител.

В предпочтительном осуществлении любой такой мутеин обладает идентичностью или гомологией с последовательностью одного из указанных антител, составляющей, по крайней мере, 40%. Более предпочтительно, он обладает идентичностью или гомологией с ней, составляющей, по крайней мере, 50%, по крайней мере, 60%, по крайней мере, 70%, по крайней мере, 80%, или, более предпочтительно, по крайней мере, 90%.

Мутеины указанных антител или их активных участков, которые могут быть применены по настоящему изобретению, или кодирующая их последовательность нуклеиновая кислота, включают ограниченный набор существенно соответствующих друг другу последовательностей, как, например, замещающие пептиды или полинуклеотиды, которые могут быть традиционно получены специалистом в данной области без постановки каких-либо обширных экспериментов, основываясь на учениях и руководствах, представленных здесь. Подробное описание белковой химии и структуры смотри в [Schulz, G.E. et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York, 1978; и Creighton T.E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983], которые включены здесь в качестве ссылки. Представление замен в нуклеотидных последовательностях, таких как предпочтения кодонов, смотри в [Ausubel et al., supra, в §§ A. 1.1-A. 1.24, и Sambrook et al., supra, в Приложениях C и D].

Предпочтительными изменениями мутеинов по настоящему изобретению являются таковые, известные как "консервативные" замены. Консервативные аминокислотные замены в указанных антителах, полипептидах или белках или их активных участках могут включать в себя синонимичные аминокислоты в пределах группы, которая обладает существенно сходными физико-химическими свойствами, так что при замене между членами группы биологическая функция молекулы сохранится, [Grantham, Science, Vol. 185, pp.862-864 (1)]. Понятно, что вставки и делеции аминокислот также могут быть выполнены и в указанных выше последовательностях без какого-либо изменения их функции, особенно, если вставки и делеции затрагивают лишь несколько аминокислот, например, до тридцати, и более предпочтительно, до десяти, и если не удалены или не замещены аминокислоты, которые обладают принципиальным значением для образования функциональной конформации, например, цистеиновые остатки, [Anfines, "Principles That Govern The Folding of Protein Chains", Science, Vol.181, pp.223-230 (1973)]. Белки и мутеины, полученные в результате таких делеции и/или вставок входят в сферу настоящего изобретения.

Предпочтительно, синонимичные аминокислотные группы представляют собой таковые, определенные в Таблице I. Более предпочтительно, синонимичные аминокислотные группы представляют собой таковые, определенные в Таблице II; и наиболее предпочтительно, синонимичные аминокислотные группы представляют собой таковые, определенные в Таблице III.

Таблица I

Предпочтительные группы синонимичных аминокислот

Аминокислота	Синонимичная группа
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gin, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp

UA 76396 C2

UA 76396 C2

Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Таблица II

Более предпочтительные группы синонимичных аминокислот

Аминокислота	Синонимичная группа
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, He
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

Таблица III

Наиболее предпочтительные группы синонимичных аминокислот

Аминокислота	Синонимичная группа
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Примеры выполнения замен аминокислот в белках, которые могут быть применены для получения мутеинов указанных антител или их активных участков для применения по настоящему изобретению включают любые известные стадии методики, такие как представленные в патентах США RE33653, 4959314, 4588585 и 4737462, выданных Mark et al.; 5116943, выданном Koths et al.; 4965195, выданном Namen et al.; 4879111, выданном Chong et al.; и 5017691, выданном Lee et al.; и лизин-замещенных белках, представленных в патенте США №4904584 (Shaw et al.).

В другом предпочтительном осуществлении настоящего, изобретения любой мутеин указанных антител или их активных участков обладает аминокислотной последовательностью существенно соответствующей таковой указанных., антител. Подразумевается, что термин "существенно соответствующий" охватывает белки с минимальными изменениями, внесенными в структуру природного белка, которые не влияют на основные характеристики природных белков, особенно когда речь идет об их способности полностью или избирательно

UA 76396 C2

UA 76396 C2

блокировать активность IFN-α и IFN-β. Тип изменений, которые как правило, считают подпадающими под определение "существенно соответствующий", представляет собой изменения, которые являются результатом применения традиционных методик мутагенеза ДНК, кодирующей последовательности данных антител, приводящего к возникновению нескольких минимальных модификаций, и скрининга на предмет желаемой активности обсуждавшимся выше способом.

Мутеины по настоящему изобретению включают белки, кодируемые нуклеиновой кислотой, такой как ДНК или РНК, которую гибридизуют с ДНК или РНК, которая кодирует последовательность указанных антител по настоящему изобретению, в строго определенных условиях. Данное изобретение также включает такую нуклеиновую кислоту, которая также применима в качестве зонда для идентификации и очистки желаемой нуклеиновой кислоты. Кроме того, такая нуклеиновая кислота будет представлять собой главную кандидатуру на определение, кодирует ли она последовательность полипептида, который сохраняет функциональную активность указанных антител по настоящему изобретению. Термин "строго определенные условия" относится к условиям гибридизации и последующей промывки, которые специалисты в данной области обычно называют "строгими". Смотри [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, NY, §§ 6.3 и 6.4 (1987, 1992) и Sambrook et al., supra]. Без какого-либо ограничения примеры строго определенных условий включают в себя условия промывки при температуре на 12-20°C ниже рассчитанной для исследуемого гибрида $T_{ПЛ}$, например, в 2*SSC и 0,5% SDS в течение 5 минут, 2*SSC и 0,1% SDS в течение 15 минут; 0,1*SSC и 0,5% SDS при 37°C в течение 30-60 минут и затем 0,1*SSC и 0,5% SDS при 68°C в течение 30-60 минут. Специалистам в данной области понятно, что строго определенные условия также зависят от длины последовательностей ДНК, олигонуклеотидных зондов (таких как длиной в 10-40 оснований) или смешанных олигонуклеотидных зондов. При применении смешанных зондов предпочтительным является использование вместо SSC хлорида тетраметиламмония (TMAC). Смотри Ausubel, supra.

Термин "гибридный белок" относится к полипептиду, содержащему указанные антитела или их активные участки или их мутеины, конденсированному с другим белком, который, например, обладает продолжительным временем циркуляции в жидкостях организма. Указанные антитела или их активные участки могут быть гибридизованы с другим белком, полипептидом и т.п.

Термин "соли" здесь относится как к солям карбоксильных групп, так и к солям добавления кислот аминогрупп указанных антител, их активных участков, мутеинов или их гибридных белков. Соли карбоксильной группы могут образовываться известным в данной области образом и включают в себя неорганические соли, например, соли натрия, кальция, аммония, железа (III) или цинка и т.п., и соли органических оснований, как, например, соли, образованные с аминами, такими как триэтаноламин, аргинин или лизин, пиперидин, прокаин и т.п. Соли добавления кислот включают в себя, например, соли минеральных кислот, таких как, например, соляная кислота или серная кислота, и соли органических кислот, таких как, например, уксусная кислота или щавелевая кислота. Разумеется, любые такие соли должны обладать существенно сходной активностью с таковой указанных антител или их активных участков.

Термин "функциональные производные", как здесь используется, охватывает производные указанных антител или их активных участков и их мутеинов и гибридных белков, которые могут быть получены из функциональных групп, которые присутствуют в качестве боковых цепей остатков или N- или C-концевых групп, известными в данной области способами, и функциональные производные включаются в область данного, изобретения, поскольку они остаются фармацевтически применимыми, т.е. они не нарушают активность белка, которая существенно сходна с активностью указанных антител, и не придают токсичных свойств содержащим их композициям. Данные композиции могут, например, содержать полиэтиленгликолевые боковые цепи, которые способны маскировать антигенные сайты и продлевать время циркуляции указанных антител или их активных участков в жидкостях организма. Другие производные включают алифатические эфиры карбоксильных групп, амиды карбоксильных групп, образованные путем реакции с аммиаком или с первичными или вторичными аминами, N-ацильные производные свободных аминогрупп аминокислотных остатков, образованные с ацильными радикалами (например, алканоильные или карбоциклические ароильные группы), или O-ацильные производные свободных гидроксильных групп (например, таковых серильных и треонильных остатков), образованные с ацильными радикалами.

Под "активными участками" указанных антител, мутеинов и гибридных белков в настоящем изобретении имеются в виду любой фрагмент или предшественники полипептидной цепи указанных антител, самих по себе или совместно с ассоциированными молекулами или присоединенными к ним остатками, например, углеводными или фосфатными остатками, или агрегаты любого из указанных выше антител при условии, что указанный участок обладает существенно сходной активностью с таковой указанных антител.

Настоящее изобретение далее относится к фармацевтическим композициям, содержащим фармацевтически приемлемый носитель и указанное антитело по данному изобретению или их активные мутеины, гибридные белки и их соли, функциональные производные или их активные участки.

Фармацевтические композиции по данному изобретению получают для введения путем смешивания указанных антител или их производных с физиологически приемлемыми носителями и/или стабилизаторами и/или наполнителями и готовят в дозированной форме, например, путем лиофилизации в дозировочных сосудах. Способ введения может представлять собой любой из общепринятых способов введения подобных средств и будет зависеть от подвергающегося лечению состояния, например, внутривенно, внутримышечно, подкожно, с помощью местной инъекции или местного нанесения, или путем непрерывной инфузии и т.д. Количество вводимого активного соединения будет зависеть от способа введения, подвергающегося лечению заболевания и состояния пациента. При местной инъекции, например, требуется меньшее количество белка на

UA 76396 C2
UA 76396 C2

массу тела, чем требуется при внутривенной инфузии.

Указанные антитела применимы для модулирования или блокирования биологической активности различных подтипов IFN-α, например, при сахарном диабете I типа, различных аутоиммунных заболеваниях, отторжении трансплантата, ВИЧ-инфекции и сходных заболеваниях, при которых имеет место нарушенная экспрессия IFN-α, т.е. указанные антитела могут быть применены при любом состоянии, при котором избыток IFN-α эндогенно продуцируется или вводится извне.

Соответственно, указанные антитела, гуманизированные антитела, их активные участки, мутеины, гибридные белки и их соли, функциональные производные и их активные участки предназначены для лечения аутоиммунных заболеваний, других воспалительных состояний в организме млекопитающих, для лечения токсических состояний, вызванных введением интерферона-альфа или интерферона-бета, юношеского диабета, системной красной волчанки и ВИЧ-инфекции.

Теперь данное изобретение будет проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами:

Пример 1: Иммунизация мышей IFNAB-BP и слияние с миеломными клетками.

Сначала самкам мышей Balb/C (в возрасте 3 месяцев) вводили 2мкг очищенного IFNAB-BP в эмульсии на основе полного адъюванта Фройнда, а через три недели подкожно в неполном адъюванте Фройнда. Пять дополнительных инъекций вводили с 10-суточным интервалом подкожно в ФБР. Сыворотки данных мышей имели титр связывания 1:100000, что определяли по методу IsRIA (смотри ниже). Антисыворотки блокировали противовирусную активность как IFN-α, так и IFN-β, что определяли в соответствии со следующей процедурой: Предварительно образованные монослои человеческих клеток WISH в 96-луночных планшетах инкубировали в течение 2ч при 37°C с двукратными разведениями антисыворотки (или моноклональных антител). Затем во все лунки добавляли IFN-α2 или IFN-β (в конечной концентрации 10ЕД/мл; калибровано относительно стандартов NIH) и далее планшеты инкубировали в течение 4ч. Затем клетки заражали вирусом везикулярного стоматита (VSV) и инкубировали в течение ночи до тех пор, пока в контрольных лунках, не содержащих IFN, не отмечался полный цитопатический эффект. За нейтрализующий титр антител в лунках, проявляющих 50% ЦПД, приняли 9единиц/мл. Следовательно, 1 блокирующая единица/мл представляет собой концентрацию антител, необходимую для блокирования активности 1ЕД/мл IFN в данных условиях анализа. Сыворотка иммунизированных мышей имела нейтрализующий титр 120000ЕД/мл как по IFN-α2, так и по IFN-β.

Окончательные повторные иммунизации очищенным IFNAB-BP проводили внутрибрюшинно за 4 и за 3 суток до слияния. Слияние проводили, применяя в качестве участников слияния миеломную клеточную линию NSO/1 и лимфоциты, полученные как из селезенки, так и из лимфатических узлов иммунизированной мыши. Слитые клетки распределяли по 96-луночным планшетам и гибридомы отбирали в DMEM, содержащей HAT и 15% лошадиную сыворотку.

Пример 2: Скрининг гибридом и характеризация моноклональных антител.

Скрининг гибридом, продуцирующих анти-IFNAB-BP моноклональ-ные антитела, проводили следующим образом: Супернатанты гибридом тестировали на предмет наличия анти-IFNAB-BP антител по методу инвертированного твердофазного радиоиммунного анализа (IsRIA) следующим образом. Планшеты для микротитрования, изготовленные из ПВХ, (Dynatech Laboratories, Alexagdria, VA) покрывали афинными очищенными козьими анти-мышиными сывороточными $F(ab)_2$ антителами (Jackson Labs, USA) (10мкг/мл, 100мкл/лунка). После инкубации при 4°C в течение ночи планшеты промывали дважды ФБР, содержащим БСА (0,5%) и Tween 20 (0,05%) и блокировали в промывающем растворе в течение, по крайней мере, 2ч при 37°C. Добавляли культуральные супернатанты гибридом (100мкл/лунка) и планшеты инкубировали в течение 4ч при 37°C. Планшеты промывали 3 раза промывным раствором, и добавляли для дальнейшей инкубации ^{125}I-IFNAB-BP (100мкл, 105 cpm) в течение 16 часов при 4°C. Планшеты промывали 3 раза и отдельные лунки выделяли и анализировали с помощью гамма-счетчика. Образцы, в которых подсчет давал результат, по крайней мере, в 5 раз превышающий значение, полученное на отрицательном контроле, расценивали как давшие положительный результат (Таблица IV). Все положительные клоны отбирали и субклонировали. Отдельные субклоны вводили мышам Balb/C, у которых с помощью pristane стимулировали выработку асцитической жидкости. Иммуноглобулины выделяли из асцитической жидкости путем осаждения сульфатом аммония (50% насыщения). Изотипы антител определяли с применением коммерчески доступного набора для ELISA (Amersham, UK).

Различные моноклональные антитела, равно как и супернатанты гибридом, концентрированные супернатанты гибридом, асцитическая жидкость или иммуноглобулины из асцитической жидкости далее тестировали на предмет их способности блокировать рецептор и препятствовать противовирусной активности IFN-α2 и IFN-β, как описано выше применительно к сыворотке иммунизированных мышей. Результаты приведены в Таблице IV. Таким образом, было обнаружено, что моноклональные антитела 16.3, 53.2 и 392.1 блокируют противовирусную активность как IFN-α2, так и IFN-β в сравнимых титрах, тогда как было неожиданно обнаружено, что титр моноклональных антител 35.9, 51.44 и 234.14 против IFN-α2 значительно выше, чем их титр против IFN-β. Таким образом, моноклинальные антитела 35.9, 51.44 и 234.14 могут быть применены в определенном интервале концентраций для избирательного блокирования активности IFN- α, тогда как активность IFN-β затронута не будет.

Таблица IV
Характеризация моноклональных антител против рецептора IFN-α/β (IFNAB-BP)

UA 76396 C2

UA 76396 C2

Антитело	IsRIA (число импульсов в минуту)	Нейтрализующий титр IFN-α2 (ЕД/мл)	Нейтрализующий титр IFN-β (ЕД/мл)	Класс Ig
16.3 Супернатант гибридомы	39103	>5120	НО	IgGl
16.3 Асцитическая жидкость [1]	НО[2]	60000	60000	IgGl
35.9 Супернатант гибридомы	33100	1280	150	IgGl
35.9 Асцитическая жидкость	НО	60000	15000	IgGl
51.44 Супертнатант гибридомы	6345	1000	<75	IgG2a
51.44 Ig (5мг/мл)	НО	15000	<2500	IgG2a
53.2 Супернатант гибридомы	26737	2000	НО	IgGl
53.2 Асцитическая жидкость	НО	120000	70000	IgGl
117.7 Супернатант гибридомы	38945	2000	НО	IgGl
117.7 Ig (10мг/мл)	НО	28800000	2000000	IgGl
234.14 Супернатант гибридомы	21812	>5120	<200	IgG2a
234.14 Ig (10мг/мл)	НО	1440000	23000	IgG2a
392.1 Супернатант гибридомы	34390	2400	НО	IgGl
392.1 Асцитическая жидкость	НО	160000	70000	IgGl

[1] Приблизительно 5мг/мл Ig.

[2] Не определялась.

Пример 3: Применение моноклональных антител для постановки на IFNAB-BPII теста ELISA

Планшеты для микротитрования (Dynatech или Maxisorb, bNunc) покрывали анти-IFNAB-BP моноклональными антителами в течение ночи при 4°C. Данное нанесение первого покрытия может быть выполнено с применением любого моноклонального антитела №46.10 (Ig фракция, 120мкл/лунка, 10мкг/мл в ФБР). Моноклональное антитело №46.10 описано в публикации ЕР №676413.

Альтернативно, для нанесения первого покрытия может быть применено моноклональное антитело №117.7. Планшеты промывали ФБР, содержащим БСА (0,5%), Tween 20 (0,05%) и NaN_3 (0,02%) (Блокирующий раствор) и блокировали в том же растворе в течение ночи при 37°C. Тестируемые образцы подвергали серийному двукратному разведению (начиная с 1:4) в Блокирующем растворе, содержащем 0,1% NP40 и 0,65M NaCl и добавляли в лунки (100мкл/лунка) на 4ч при 37°C. Планшеты затем промывали 3 раза ФБР, содержащим 0,05% Tween 20 (ФБР/Tween) с последующим добавлением биотинилированного моноклонального антитела №234.14 (1:1000 в Блокирующем растворе, но без NaN_3 100мкл/лунка) для дальнейшей инкубации в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 3 раза ФВР/Tween (100мкл/лунка) и в течение 2ч при комнатной температуре добавляли конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена (Jackson Labs, 1:10000 в ФБР/Tween, 100мкл/лунка). Планшеты промывали 3 раза ФБР/Tween, и после добавления в каждую лунку 100мкл свежеприготовленного раствора АБТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты, Sigma, 10мг; 6,4мл H_2O; 2,2мл 0,2M Na_2HPO_4, 1,4мл 0,2M лимонной кислоты; 1мкл H_2O_2) в качестве субстрата развивалась окраска. Окраска развивается в течение 30мин и реакция может быть остановлена путем добавления 100мкл/лунка 0,2M лимонной кислоты. Данные с планшетов были считаны автоматическим ELISA-ридером при 405нм делая поправку на неспецифическое считывание при 630нм. Нижний предел определения в данном анализе составлял 30пг/мл.

Предшествующее описание конкретных осуществлений выявляет общую природу данного изобретения, так что другие могут, применяя данные знания, с легкостью модифицировать и/или приспосабливать такие конкретные осуществления для различных приложений без отдаления от основополагающей концепции, и, таким образом, такие приспособления и модификации должны и предназначены для того, чтобы быть охвачены значением и кругом эквивалентов описанных осуществлений. Следует понимать, что фразеология и терминология, применяемая здесь, служит цели описания, а не ограничения.

Гидридомы 46.10, 117.7 и 234.14 были положены на хранение в Pasteur Institut (CNCM) под номерами хранения I-1697, I-1698 и I-1699, соответственно, 23 апреля 1996 года.

Ссылки

1. Taylor, J.L., et al., "Recent progress in interferon research: molecular mechanisms of regulation, action and virus circumvention", Virus fcessaiSh, 15:1-26. 1990.

2. Bisceglic, A.M., et al., "Recombinant interferon alpha therapy for chronic hepatitis C A randomized, double-bind, placebo-controlled trial", New Eny. JMed..321: 1506-1510,1989.

3. McDonnell, W.M., et al., "Acute hepatitis C infection: interferon finally succeeds", Gastroenterology (US), 103: 1359-1360, 1992.

4. Friedman-Kien, A.E., et al., "Natural interferon alpha for treatment of condylomata acuminata", J. Am. Med. Assn., 259: 533-538, 1988.

5. Mains, J., et al., "Interferon: current and future clinical uses in infectious disease practice". Int. J. Stud. AIDS. 3:4-9, 1992.

6. Berman, E., et al., "Incidence of response and long term follow up in patients with hairy cell

UA 76396 C2

UA 76396 C2

leukemia treated with recombinant interferon Alpha-2a", Blood. 75: 839-845, 1990.
7. Talpaz, M., et al., "Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia", BJood, 69: 1280-1288, 1987.
8. De Wit, R., et al., "Clinical and virological effects of high-dose recombinant-interferon-a in disseminated AIDS-related Kaposi's sarcoma", Lancet. 2: 1214-1222, 1988.
9. Klippel, J.H., et al., "Serum alpha interferon and lymphocyte inclusions in systemic lupus erythematosus", Annals of the Rheumatic Diseases. 44: 104-108, 1985.
10. Lau, A.S., et al., "Regulation of tumor necrosis factor receptor expression by acid-labile interferon-alpha from AIDS sera", AIDS Res. Hum. Retroviruscs. 7: 545-552, 1991.
11. Stewart, T.A., "Induction of type I diabetes by interferon-a in transgenic mice", Science. 260: 1942-1946, 1993.
12. Tsavaris, N., et al., "Treatment of renal cell carcinoma with escalating doses of alpha-interferon". Chemotherapy (Switzerland), 39: 361-366, 1993.
13. Branka, A.A., et al., "Evidence that types I and II interferons have different receptors". Nature. 294: 768-770, 1981.
14. Uze, G., et al., "Genetic transfer of a functional human interferon a receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA", Cell. 60: 225-234, 1990.
15. Colamonici, O.R., et al., "Characterization of three monoclonal antibodies that recognize the mterferon-a2 receptor", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:7230-7234, 1990.
16. Platanias, L.C., et al., "Expression of the IFN-receptor in hairy cell leukemia", Brit. J Haematology. 82: 541-546, 1992.
17. Colaminici, OR., et al., "Identification of a novel subunit of the type I Interferon receptor localized to human chromosome 21", J. Biol. Chem., 268: 10895-10899, 1993.
18. Benoit, P., et al., "A monoclonal antibody to recombinant human IFN-a receptor inhibits biologic activity of several species of human IFN-α IFN-β and IFN-omega". J. Immunol.. 150:707-716, 1993.
19. Novick, D., et al., "The Human Interferon /wbw receptor: Characterization and molecular cloning", Cell, 77: 391-400, 1994.
20. Cohen, B., et al., "Ligand-induced association of the Type I interferon receptor components". Molec. Cell. Biol., 15: 4208-4214, 1995.
21. Benoit, P., et al., "A Monoclonal Antibody to Recombinant Human IFN-aipha Receptor Inhibits Biologic Activity of Several Species of Human IFN-aipha, IFN-beta, and IFN-omega - Detection of Heterogeneity of the Cellular Type-I IFN Receptor". J. Immunol., 150(3): 707-716, 1993.
22. Colamonici, O.R., et al., "Identification of a Novel Subunit of the Type-I bterferon Receptor Localized to Human Chromosome-21", J. Biol. Chem., 268(15): 10895-10899, 1993.
23. Pearson, W.R., et al., "Improved tools for biological sequence comparison", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 2444-2448, 1988.
24. Okayama, H., et al., "A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells", Mol. Cell. Biol., 3: 280-289, 1983.
25. Maniatis, et al.. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
26. Gryczan, T., The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, NY (1982), pp.307-329.
27. Kendall, K.J. et al., J. Bacteriol., 169: 4177-4183, 1987.
28. Chater, K.F., et al., in "Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology", Akademiai Kaido, Budapest, Hungary (1986), pp.45-54.
29. John, J.F., et al., (1986) Rev. Infect. Dis., 8: 693-704.
30. Izaki, K., (1978) Jpn. J. Bactcriol., 33: 729-742.
31. Botstein, D., et al., (1982) Miami Wint. Svmp., 19:265-274.
32. Broach, J.R., in "The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. pp.445-470, 1981.
33. Broach, J.R., (1982) Cell, 28:203-204.
34. Bollon, D.P., et al., (1980) J. Clin. Hematol. Oncol., 10: 39-48.
35. Maniatis, T., in "Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol.3: Gene Expression", Academic Press, NY, pp.563-608, 1980.
36. Mizushima, S., et al., "pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector". Nucleic Acid Res., 18: 5322-5328, 1990.
37. Byrn. R.A., et al., Nature fcondonl 344: 667-670, 1990.
38. Frohman, M.A., et al., Proc. Nad. Acad. Sci. USA. 85: 8998-9002, 1988.
39. Graham, F.L., et al., Virology. 52: 456-467, 1973.
40. Munson, P.J., et al., Anal. Biochem., 107: 220-239, 1980.

Формула винаходу

1. Моноклональне антитіло, яке експресується гібридомою, що зберігається в Інституті Пастера (CNCM) під номером I-1698, і здатне зв'язуватися з рецептором IFN-α/β і блокувати біологічну активність IFN-α і IFN-β, і створювати більш високий антивірусний блокуючий титр проти IFN-α, ніж проти IFN-β.

2. Моноклональне антитіло, яке експресується гібридомою, що зберігається в Інституті Пастера (CNCM) під

UA 76396 C2
UA 76396 C2

номером I-1699, і здатне зв'язуватися з рецептором IFN-α/β і блокувати біологічну активність IFN-α і IFN-β, і створювати більш високий антивірусний блокуючий титр проти IFN-α, ніж проти IFN-β.

3. Гуманізоване моноклональне антитіло, що містить варіабельні домени антитіла за п. 1 або 2 і константний домен імуноглобуліну людини.

4. Фармацевтична композиція для модуляції або блокування біологічної активності IFN-α, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-3 і фармацевтично прийнятний носій.

5. Застосування антитіла за п. 1 для приготування фармацевтичної композиції для модуляції або блокування біологічної активності IFN-α.

6. Застосування антитіла за п. 2 для приготування фармацевтичної композиції для модуляції або блокування біологічної активності IFN-α.

7. Застосування антитіла за п. 3 для приготування фармацевтичної композиції для модуляції або блокування біологічної активності IFN-α.

8. Гібридома, яка експресує антитіло за п. 1, позначена як NUR 2 117.7 і депонована в Інституті Пастера (CNCM) під номером I-1698 23 квітня 1996 р.

9. Гібридома, яка експресує антитіло за п. 1, позначена як NUR 2 234.14 і депонована в Інституті Пастера (CNCM) під номером I-1699 23 квітня 1996 р.

10. Набір для проведення ELISA-аналізу IFNAB-BPI і/або IFNAB-BPII, який містить промислові планшети для мікротитрування, що містять перше покриття моноклональним антитілом, продукованим гібридомою за п. 8, і друге покриття моноклональним антитілом, продукованим гібридомою за п. 9.

Офіційний бюлетень "Промислоава власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2006, N 8, 15.08.2006. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

UA 76396 C2

UA 76396 C2