



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012113360/10, 06.04.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
06.04.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.04.2012

(45) Опубликовано: 20.11.2013 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: TAYLOR P. C. "Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases." Current opinion in pharmacology (2010), 10(3): 308-315. WEIR N. et al., "A new generation of high-affinity humanized PEGylated Fab fragment anti-tumor necrosis factor- $\alpha$ ; monoclonal antibodies." Therapy (2006), 3(4): 535-545. WO (см. прод.)

Адрес для переписки:

117149, Москва, Симферопольский б-р, 8,  
ОАО "Всероссийский научный Центр  
молекулярной диагностики и лечения" (ОАО  
"ВНЦМДЛ"), П.Г.Свешникову

(72) Автор(ы):

Солопова Ольга Николаевна (RU),  
Позднякова Любовь Петровна (RU),  
Свешников Петр Георгиевич (RU),  
Беневоленский Сергей Владимирович (RU),  
Ягудин Тимур Анверович (RU),  
Зацепин Сергей Сергеевич (RU),  
Морозкина Елена Владимировна (RU),  
Клячко Елена Витальевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Открытое акционерное общество  
"Всероссийский научный Центр  
молекулярной диагностики и лечения"  
(ОАО "ВНЦМДЛ") (RU)

(54) ВАРИАБЕЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ ЛЕГКОЙ И ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ МЫШИНОГО  
МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА  
(ФНО- $\alpha$ ) ЧЕЛОВЕКА (ВАРИАНТЫ), АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ (Fab) ПРОТИВ  
ФНО- $\alpha$  ЧЕЛОВЕКА, СОДЕРЖАЩИЙ УКАЗАННЫЕ ДОМЕНЫ (ВАРИАНТЫ)

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области иммунологии. Предложены вариabельные домены тяжелых (VH) и легких (VL) цепей мышиногo антитела против фактора некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ) человека, а также антигенсвязывающий

фрагмент Fab, которые селективно связываются с ФНО- $\alpha$  человека и нейтрализуют его. Данное изобретение может найти дальнейшее применение в разработке лекарственных средств для лечения ФНО- $\alpha$ -опосредованных заболеваний и в диагностике таких заболеваний. 3 н.п. ф-лы, 5 табл., 7 пр.

(56) (продолжение):

2008/124170 A2, 16.10.2008. US 6232446 B1, 15.05.2001. RU 2268266 C2, 20.01.2006.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/24* (2006.01)  
*C12P 21/08* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2012113360/10, 06.04.2012

(24) Effective date for property rights:  
06.04.2012

Priority:

(22) Date of filing: 06.04.2012

(45) Date of publication: 20.11.2013 Bull. 32

Mail address:

117149, Moskva, Simferopol'skij b-r, 8, OAO  
"Vserossijskij nauchnyj Tsentr molekularnoj  
diagnostiki i lechenija" (OAO "VNTsMDL"),  
P.G.Sveshnikovu

(72) Inventor(s):

Solopova Ol'ga Nikolaevna (RU),  
Pozdnjakova Ljubov' Petrovna (RU),  
Sveshnikov Petr Georgievich (RU),  
Benevolenskij Sergej Vladimirovich (RU),  
Jagudin Timur Anverovich (RU),  
Zatsepin Sergej Sergeevich (RU),  
Morozkina Elena Vladimirovna (RU),  
Kljachko Elena Vital'evna (RU)

(73) Proprietor(s):

Otkrytoe aktsionernoje obshchestvo "Vserossijskij  
nauchnyj Tsentr molekularnoj diagnostiki i  
lechenija" (OAO "VNTsMDL") (RU)

(54) **VARIABLE DOMAINS OF LIGHT AND HEAVY CHAIN OF MURINE MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- $\alpha$ ) OF HUMAN BEING (VERSIONS); ANTIGEN-BINDING FRAGMENT (Fab) AGAINST TNF- $\alpha$  OF HUMAN BEING, WHICH CONTAINS ABOVE SAID DOMAINS (VERSIONS)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention proposes variable domains of heavy (VH) and light (VL) chains of murine antibody against tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) of a human being, as well as antigen-binding fragment Fab, which are selectively bound to

TNF- $\alpha$  of the human being and neutralise it.

EFFECT: invention can be further used in development of medicines for therapy of TNF- $\alpha$ -mediated diseases and for diagnostics of such diseases.

3 cl, 5 tbl, 7 ex

RU 2 499 000 C1

RU 2 499 000 C1

## Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам, в частности к переменным доменам легкой и тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела, связывающегося с фактором некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ) человека и 5 нейтрализующего его, и антигенсвязывающему фрагменту (Fab) против ФНО- $\alpha$  человека, содержащему указанные домены.

## Предшествующий уровень техники

Среди хронических воспалительных заболеваний самым частым является 10 ревматоидный артрит (РА). По данным ВОЗ встречаемость этого заболевания колеблется от 0,6 до 1,3%. Ежегодно диагноз «ревматоидный артрит» получает 0,02% населения Земного шара. Из-за постоянных болей в суставах и нарушения их функций 50% больных РА становятся инвалидами в течение 5 лет после начала 15 заболевания, 10% больных становятся инвалидами менее чем за 2 года. Заболевание РА происходит и в детском (ювенильный РА), и в пожилом возрасте, но основной контингент заболевших - это лица среднего возраста, наиболее часто ревматоидный артрит впервые регистрируется у пациентов в возрасте 30-35 лет. Преждевременная 20 утрата трудоспособности вследствие РА приводит к существенным экономическим потерям. Продолжительность жизни больных РА снижается вследствие развития сопутствующих заболеваний, а также в результате побочных эффектов проводимого 25 лечения. Наиболее частыми сопутствующими заболеваниями являются: поражения легких (до 70% всех больных РА), поражения сердечно-сосудистой системы, приводящие к уменьшению продолжительности жизни на 10-15 лет; поражение почек, 30 сопровождающееся артериальной гипертензией; поражения ЖКТ, нервной, эндокринной систем, развитие онкологических заболеваний, главным образом, неходжкинских лимфом. Риск заболеть этим видом рака у больных РА повышается в 26 раз.

30 Этиология ревматоидного артрита остается невыясненной, так же как и этиология других заболеваний, характеризующихся состоянием хронического воспаления (псориаз, болезнь Крона и др.), поэтому основной целью лечения этих заболеваний является достижение клинико-лабораторной ремиссии, предотвращение 35 деструктивных преобразований органов, подверженных воспалению, и инвалидизации пациентов.

Фактор некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ) является ключевым медиатором воспалительных реакций, его ингибиторы широко используются как основа 40 препаратов для лечения состояний хронического воспаления, таких как ревматоидный артрит, псориаз, болезнь Крона, псориатический артрит, саркоидоз, болезнь Бехтерева и др. Такие препараты доказали свою эффективность везде, где они используются, в том числе и в России, они способны приводить больного в состояние длительной 45 стойкой ремиссии.

Наиболее значительных успехов в достижении ремиссии удается достигнуть с 45 помощью препаратов, блокирующих действие ФНО- $\alpha$ . Первым таким зарегистрированным препаратом стал препарат Ремикейд (Remicade®), разработанный английской компанией «Centocor» в 1993 году (Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, et al.: 50 Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. Mol. Immunol. 1993 Nov;30(16): 1443-53). Основу препарата составляет химерное антитело infliximab, полученное из мышинового моноклонального антитела путем замены мышинных константных областей IgG на человеческие. Во избежание

иммунореактивности препарат рекомендуется вводить одновременно с приемом цитостатика, как правило, метотрексата.

Дальнейшая эволюция фармпрепаратов была направлена на снижение их иммуногенности и эффекта привыкания, повышение времени полураспада в организме. Новые препараты на рынке блокаторов ФНО- $\alpha$  - это Симпони (Simponi<sup>®</sup>, антитело Golimumab; Евразийские патенты EA007005 B1 и EA009288 B1) и Симзия (Cimzia<sup>®</sup>, антитело Certolizumab pegol; патент РФ 2303604). Последний примечателен тем, что представляет собой не полноразмерную молекулу антитела против ФНО- $\alpha$ , а ее антигенсвязывающий фрагмент (Fab-фрагмент).

Однако существует целый ряд ограничений в использовании блокаторов ФНО- $\alpha$ : во-первых, их высокая стоимость; во-вторых, наличие побочных действий; в-третьих, не у всех пациентов применение блокаторов ФНО- $\alpha$  оказывается эффективным; в-четвертых, отсутствуют отечественные препараты на основе блокаторов ФНО- $\alpha$ . Все это заставляет продолжать исследования по поиску новых противовоспалительных средств.

Высокая стоимость препаратов во многом обусловлена тем, что они представляют собой полноразмерные гликозилированные моноклональные антитела либо рецептор ФНО- $\alpha$  1 типа, соединенный с Fc-фрагментом человеческого иммуноглобулина. Такие молекулы могут производиться только в эукариотической экспрессионной системе, и их продукция весьма затратна. Переход от полноразмерных молекул, произведенных эукариотами, к Fab-фрагментам, произведенным в дрожжевой системе экспрессии и «утяжеленным» полиэтиленгликолем, позволит существенно снизить себестоимость производства препарата без потери эффективности. Такой препарат, Симзия (Cimzia<sup>®</sup>, антитело Certolizumab pegol; патент РФ 2303604), уже существует. Другая причина высокой стоимости лечения блокаторами ФНО- $\alpha$  - высокие дозы вводимых препаратов: например, дозировка ремикейда - 3-5 мг/кг веса пациента в зависимости от диагноза.

#### Краткое описание изобретения

Целью настоящего изобретения является получение мышинных антител, связывающихся с фактором некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ) человека и нейтрализующих его, определение последовательностей переменных доменов тяжелых (VH) и легких (VL) цепей указанных антител и получение антигенсвязывающих фрагментов (Fab) мышинного антитела, связывающихся с ФНО- $\alpha$  человека и нейтрализующих его.

Указанная цель была достигнута путем выделения двух мышинных антител, E2 и F11, обладающих способностью к ингибированию активности ФНО- $\alpha$  человека, и определения последовательности их переменных участков.

Настоящее изобретение представляет собой переменный участок тяжелой цепи (VH) антитела E2, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1, переменный участок легкой цепи (VL) указанного антитела, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 2, а также антигенсвязывающий фрагмент (Fab), содержащий указанные переменные участки.

Также настоящее изобретение представляет собой переменный участок тяжелой цепи (VH) антитела F11, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 3, переменный участок легкой цепи (VL) указанного антитела, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 4, а также антигенсвязывающий фрагмент (Fab), содержащий указанные переменные участки.

Подробное описание настоящего изобретения

Антитела обычно состоят из двух тяжелых цепей, связанных между собой дисульфидными связями, и легких цепей, ассоциированных с N-концом каждой из тяжелых цепей. Каждая тяжелая цепь содержит на N-конце переменный домен с константным доменом на другом конце. Каждая легкая цепь также содержит на N-конце переменный домен с константным доменом. Переменные домены каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют антигенсвязывающий фрагмент (Fab). Переменные домены легкой и тяжелой цепей обладают похожей общей структурой, и каждый домен включает каркас из четырех участков, последовательности которых являются относительно консервативными, связанных посредством трех участков, определяющих комплементарность (complementarity determining regions, CDRs). Четыре каркасных участка формируют конформацию типа бета-складчатого слоя, а CDRs образуют петли, связывающие конструкцию из бета-складчатого слоя. Участки CDRs расположены в непосредственной близости друг от друга благодаря каркасным участкам и вносят вклад в образование антигенсвязывающего участка. Участки CDRs и каркасные участки антител могут быть определены путем ссылки на нумерационную систему Кабата (Kabat numbering system, Kabat et al., (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office) в сочетании in conjunction with x-ray crystallography, as set forth in W091/09967.

Для получения антитела, которое может связываться с каким-либо специфическим антигеном, обычно используют методику Kohler и Milstein (Kohler et al., (1976) Nature 256:495-497), получившую название гибридомной технологии. Суть метода сводится к получению культуры «бессмертных» гибридов (гибридом) путем слияния плазматической клетки (В-лимфоцита, продуцирующего антитела) и опухолевой клетки (миеломы или плазмоцитомы). Полученная гибридома способна продуцировать моноклональные антитела (как В-клетка) и при этом бесконечно делится (как опухолевая клетка), что позволяет достаточно долгое время секретируют in vitro или in vivo антитело, специфическое для целевого антигена.

Слияние клеток происходит под действием полиэтиленгликоля, изолецитина или вируса Сендай. На следующем этапе необходимо отобрать не слившиеся с лимфоцитами миеломные клетки (неслившиеся лимфоциты убирать не нужно: через недолгое время они погибнут сами). В процессе такой селекции гибридомные клетки высаживают на среды, содержащие вещества, блокирующие синтез нуклеотидов миеломными клетками. Для этого выведены специальные мутантные миеломные клеточные линии, дефектные по некоторым ферментам, участвующим в синтезе нуклеотидов.

Отбор гибридом, секретирующих нужные антитела, проводится путем проверки среды, в которой росли клетки, на предмет наличия в ней антител нужной специфичности.

Таким образом отбирают клетки, секретирующие антитела стабильно и в достаточном количестве. Большой объем антител нарабатывают или in vitro, или путем введения гибридом в перитонеальную полость мышей для получения асцита (Свешников. П.Г. Введение в молекулярную иммунологию и гибридомную технологию / П.Г.Свешников, В.В.Малайцев, И.М.Богданова, О.Н.Солопова // изд. МГУ. - М. - 2006).

Получение материала, используемого в качестве антигена, для инъекций животных включают в себя методики, хорошо известные из уровня техники, например использование полноразмерного белка, использование пептида, выбранного из

иммуногенных участков белка, модифицирование антигена такими способами, как, например, связывание с динитрофенолом, связывание с арсаниловой кислотой, денатурация антигена, связывание антигена с белком-переносчиком, таким как, например, гемоцианин улитки, с пептидами, содержащими участки связывания с рецепторами Т-клеток класса II, с бусинами, а также любыми другими методами, известными из уровня техники. См. *Harlow* и др. (см. выше).

В частности, антителами, обладающими способностью к связыванию с фактором некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ) человека и нейтрализации его, являются антитела, содержащие переменные домены тяжелой и легкой цепи согласно настоящему изобретению. Указанные переменные домены тяжелой цепи мышиного моноклонального антитела содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, а переменные домены легкой цепи антитела (VL) содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, необходимые для функционирования указанного антитела. Изолированный антигенсвязывающий фрагмент (Fab) согласно настоящему изобретению, селективно связывающийся с ФНО- $\alpha$  человека и нейтрализующий его, включает в себя переменный домен тяжелой цепи (VH) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1 и переменный домен легкой цепи (VL) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 2 или переменный домен тяжелой цепи (VH) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 3 и переменный домен легкой цепи (VL) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4.

В настоящем изобретении фраза "антитело или Fab, обладающие способностью к связыванию с фактором некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ) человека и нейтрализации его" означает молекулу, которая связывается с ФНО- $\alpha$  человека, образует стабильный комплекс и ингибирует активность ФНО- $\alpha$  человека. Стабильным комплексом является комплекс, в котором связывание между партнерами происходит на период времени, достаточный для того, чтобы произвести детектирование указанного комплекса с использованием описанных здесь методов. Термин "селективно связывается ФНО- $\alpha$  человека" означает способность указанной молекулы предпочтительно связываться с ФНО- $\alpha$  человека в отличие от связывания с белками, не имеющими отношения к ФНО- $\alpha$  человека, или связывания с небелковыми компонентами, присутствующими в образце. Антитело или Fab, которые предпочтительно связываются с ФНО- $\alpha$  человека, являются антителом или Fab, которые связываются с ФНО- $\alpha$  человека, но не связываются в существенной степени с другими молекулами или компонентами, которые могут присутствовать в образце. Такое существенное связывание предполагает, например, связывание антитела или Fab, связывающихся с ФНО- $\alpha$  человека, с молекулой, не являющейся ФНО- $\alpha$  человека, с аффинностью или силой, достаточной для того, чтобы помешать способности антитела, связывающегося с ФНО- $\alpha$  человека, определить уровень ФНО- $\alpha$  человека в образце. Примерами таких молекул и компонентов, которые могут присутствовать в образце, являются, но не ограничиваются ими, белки, не являющиеся ФНО- $\alpha$ , липиды и углеводы.

Способность антитела или Fab к связыванию с антигеном может быть определена специалистом в данной области с использованием методов, включающих, но не ограничивающихся методом ELISA и равновесным диализом. Методы определения аффинности и силы связывания хорошо известны специалисту в данной области техники, подробно описаны *Janeway* и др. (*Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (Garland Publishing Company, 1996)).

Fab, пригодный для осуществления настоящего изобретения, - это Fab, обладающий способностью к связыванию с ФНО- $\alpha$  человека и нейтрализации его, когда концентрация ФНО- $\alpha$  человека составляет от около 10 нг/мл и до около 10 пг/мл. В частности, пригодные в рамках настоящего изобретения Fab связывают ФНО- $\alpha$  человека и нейтрализуют его, когда концентрация ФНО- $\alpha$  человека составляет 10 нг/мл, около 1 нг/мл или менее, предпочтительно 100 нг/мл. Такие антитела и Fab описаны в сопутствующих Примерах.

Fab моноклональных мышинных антител в соответствии с настоящим изобретением, которые селективно связываются с ФНО- $\alpha$  человека и нейтрализуют его, также могут быть получены с использованием подходящей гибридомы. Гибридомы могут быть выращены в питательной среде, и накопленные антитела могут быть выделены. Здесь и далее термин "выращиваемые клетки" относится к гибридомам или другим линиям клеток, которые производят антитела. Способы получения и проверки таких выращиваемых клеток описаны Harlow и др. (см. выше). Методы получения антигенного материала для инъекций в животное включают в себя методы, известные из уровня техники, например использование полноразмерного белка, пептидов, выбранных из иммуногенного участка этого белка, модифицирование антигена такими способами, как, например, связывание с динитрофенолом, связывание с арсаниловой кислотой, денатурация антигена, связывание антигена с белком-переносчиком, таким как, например, гемоцианин улитки, с пептидами, содержащими участки связывания с рецепторами Т-клеток класса II, с бусинами, а также любыми другими методами, известными из уровня техники. Смотри Harlow и др. (см. выше).

Fab, связывающиеся с ФНО- $\alpha$  человека и нейтрализующие его, согласно настоящему изобретению могут включать в себя многофункциональные молекулы, например бифункциональные молекулы, содержащие, по крайней мере, одну функциональную часть, которая специфически связывается с ФНО- $\alpha$  человека и нейтрализует его. Такие многофункциональные молекулы могут включать в себя, например, химерные молекулы, включающие в себя молекулу, которая связывается с ФНО- $\alpha$  человека и нейтрализует его, и вторую часть, которая дает возможность данной химерной молекуле связываться с субстратом или позволяет детектировать ее способом, при котором связывание с ФНО- $\alpha$  человека и его нейтрализация не ухудшаются. Примерами таких вторых частей являются, но не ограничиваются ими, фрагменты молекулы иммуноглобулина, флуоресцентный белок или фермент. Также Fab, связывающиеся с ФНО- $\alpha$  человека и нейтрализующие его, согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы полиэтиленгликолем, т.е. пегилированы.

Термин "взаимодействие", использованный здесь, означает введение, добавление образца, предположительно содержащего ФНО- $\alpha$  человека, к Fab, связывающему ФНО- $\alpha$  человека, например, путем объединения или смешения образца с Fab. В случае, если ФНО- $\alpha$  человека присутствует в образце, образуется комплекс Fab с ФНО- $\alpha$  человека; образование такого комплекса означает способность Fab селективно связываться с ФНО- $\alpha$  человека с образованием стабильного комплекса, который может быть детектирован. Детектирование может быть качественным, количественным или полуколичественным. Связывание ФНО- $\alpha$  человека из образца с Fab происходит в условиях, подходящих для формирования комплекса. Такие условия (например, подходящие концентрации, буферы, температура, время реакции), а также методы оптимизации таких условий хорошо известны специалисту в данной области техники. Связывание может быть обнаружено и измерено с использованием

множества методов, являющихся стандартными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, ферментативные методы иммунохимии (например, ELISA), иммунопреципитации, методы иммуноблотинга и другие методы иммунохимии, описанные, например, Sambrook и др. (см. выше) и Harlow и др. (см. выше). Эти ссылки также описывают примеры условий, в которых образуется комплекс.

Фразы «нейтрализует ФНО- $\alpha$  человека», «ингибирует активность ФНО- $\alpha$  человека» означают, что указанное антитело или Fab связывается с ФНО- $\alpha$  человека таким образом, что нейтрализует его, то есть ингибирует активность ФНО- $\alpha$  и блокирует его действие в качестве ключевого медиатора воспалительных реакций. Способность антитела или Fab к нейтрализации (ингибированию) ФНО- $\alpha$  человека может быть определена, например, методом, описанным в Примерах 3 и 4.

Методы получения плазмидной ДНК, расщепления и лигирования ДНК, трансформации, подбора олигонуклеотидов в качестве праймеров и подобные методы могут быть стандартными методами, хорошо известными специалисту в данной области техники. Эти методы описаны, например в Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)).

Последующие примеры приведены для целей объяснения и не ограничивают каким-либо образом рамки настоящего изобретения.

#### Пример 1. Получение мышечных антител против ФНО- $\alpha$ человека

Для получения антител мышечной линии BALB/c иммунизировали дважды с интервалом в 2 недели в подушечки задних лап раствором иммуногена в полном (для первой иммунизации) или неполном (для второй иммунизации) адьюванте Фройнда. Гибридизацию клеток подколенных лимфоузлов иммунных мышей с клетками миеломы линии sp2/0 проводили по стандартной методике с использованием полиэтиленгликоля с молекулярной массой 4000 (Kohler, G. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity / G. Kohler, C. Milstein // Nature. - 1975. - V. 256. - P. 495-497). Скрининг супернатантов гибридных клеток тестировали методом твердофазного иммуноферментного анализа на содержание антител против полноразмерного ФНО- $\alpha$  (Engvall, E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. / E. Engvall, P. Perlmann. // Immunochemistry. - 1971. - V. 8(9). - P. 871-4). Субизотип определяли при помощи антисывороток, специфичных к определенным субизотипам мышечных иммуноглобулинов, по методике, рекомендованной производителем (Sigma, IS02-1KT). Пятнадцать антител было получено в результате иммунизации полноразмерным рекомбинантным ФНО- $\alpha$ , из которых затем (см. Примеры 2-4) были отобраны 2 антитела, TNF E2 и TNF F11, обладающих наибольшей ингибирующей активностью. Субизотипы указанных антител приведены в Таблице 1.

Антитела нарабатывали в асцитных жидкостях мышей, затем очищали методом аффинной хроматографии на белок-Ж сефарозе (Jungbauer, A. Comparison of protein A, protein G and copolymerized hydroxyapatite for the purification of human monoclonal antibodies / A. Jungbauer et al. // J.Chromatogr. - 1989. - V. 476. - P. 257-268). Степень чистоты препаратов антител контролировали при помощи электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии SDS и DTT в ступенчатой буферной системе Лэммли, используя Mini PROTEAN 3 Electrophoresis System BIO-RAD, Catalog N 165-3301 (Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. - 1970. - V. 227. - P. 680-685). Чистота всех полученных антител составила не менее 95%.

Пример 2. Характеристика мышинных моноклональных антител против ФНО- $\alpha$  в иммуноферментном анализе

Антитела тестировали в иммуноферментном анализе двумя способами: непрямой ИФА и ИФА с биотинилированным ФНО- $\alpha$ .

5 - Непрямой ИФА. Антиген ФНО- $\alpha$  сорбировали в концентрации 2 мкг/мл при температуре 4°C в течение ночи в ФСБ (0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М NaCl), pH 7,2-7,4 на 96-луночные планшеты с высокой связывающей способностью производства Coming-Costar (Нидерланды, кат.номер 9018). Антитела и конъюгаты разводили в буфере ФСБ-АТ (0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М NaCl; 0,2% бычий сывороточный альбумин; 0,1% Твин 20). Конечную точку титрования антитела определяли как концентрацию антитела, при которой оптическая плотность в лунке достоверно отличается от оптической плотности в лунке без антител (от уровня фона). Значения конечных точек титрования для антител TNF E2 и TNF F11 приведены в Таблице 2.

15 - ИФА с биотинилированным ФНО- $\alpha$ . Все МоАт сорбировали на планшет в концентрации 2,5 мкг/мл в 0,1 М карбонатном буфере pH 9,3. ФНО- $\alpha$ , конъюгированный с биотином, разводили и титровали в буфере ФСБ-АТ в диапазоне концентраций от 300 нг/мл до 0,1 нг/мл. В качестве конъюгата использовали коммерческий препарат ExtrAvidin Peroxidase Conjugate (SIGMA, lot 103K4840). Конъюгат разводили в том же буфере до концентрации 150 нг/мл. Все инкубации проводили при комнатной температуре. В качестве контроля брали антитела infliximab (коммерческий препарат Remicade®). Конечную точку титрования ФНО- $\alpha$  определяли как концентрацию биотинилированного ФНО- $\alpha$ , при которой оптическая плотность в лунке достоверно отличается от оптической плотности в лунке без ФНО- $\alpha$  (от уровня фона). Значения конечных точек титрования ФНО- $\alpha$  для антител TNF E2 и TNF F11 приведены в Таблице 2.

25 - Характеристика полученных моноклональных антител в биохимических константах.

30 Для измерения аффинности МоАт использовали метод иммуноферментного анализа (Klotz, I.M. The Proteins / I.M. Klotz, H.Neurath, K.Bailey// Academic Press, New York. - 1953. - V.1. - P. 727). В качестве антигена использовали антиген ФНО- $\alpha$ , сорбированный на планшет в концентрации 2 мкг/мл. Константу диссоциации (Kd) измеряли по методике, описанной в работе Friguet с соавт. (Friguet, B. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. / B. Friguet, A.F. Chaffotte, L. Djavadi-Ohanian, M. E. Goldberg // Journal of Immunological Methods. - 1985. - V.77. - P.305-319). Результаты показаны в Таблице 2.

Пример 3. Изучение in vivo нейтрализующей активности мышинных моноклональных антител

45 Клетки мышинной фибросаркомы линии L929 нарабатывали в полной питательной среде DMEM с высоким содержанием глюкозы с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки, L-глутамина и пирувата в концентрациях согласно рекомендациям производителей. Клетки высевали в лунки 96-луночного планшета в полной питательной среде из расчета  $10^4$  клеток на лунку. К клеткам добавляли рекомбинантный ФНО- $\alpha$  (Sigma, США) в разных концентрациях так, чтобы максимальная конечная концентрация в лунке составляла 1000 нг/мл, а каждая последующая концентрация отличались от предыдущей в два раза (шаг 2). Затем планшеты инкубировали в течение суток при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа. После этого добавляли раствор МТТ до конечной концентрации 0,5 мг/мл и

инкубировали при тех же условиях еще 4 часа. Затем все содержимое планшетов вытряхивали и добавляли диметилсульфоксид (ДМСО) по 100 мкл в каждую лунку. Через 10 минут измеряли оптическую плотность раствора в каждой лунке при длине волны 595 нм. Таким образом была определена рабочая концентрация ФНО- $\alpha$  100 нг/мл, близкая к насыщающей. Для определения нейтрализующей (ингибирующей) способности антител клетки L929 сеяли в лунки 96-луночного планшета, как описано выше. К клеткам L929 добавляли антитела в различных концентрациях, начиная с 10 мкг/мл с шагом 2, и ФНО- $\alpha$  в концентрации 100 нг/мл. В контрольные лунки добавляли антитела без ФНО- $\alpha$  («+» контроль) или ФНО- $\alpha$  с антителами против постороннего антигена («-» контроль). Инкубировали в течение суток при 37°C в инкубаторе с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub>, затем добавляли МТТ и инкубировали еще 4 часа. По окончании инкубации содержимое лунок вытряхивали и добавляли в лунки ДМСО. Через 10 минут измеряли оптическую плотность в лунках при длине волны 595 нм.

Нейтрализующую (ингибирующую) активность антител (IC<sub>50</sub>) вычисляли следующим образом: для каждой концентрации антитела находили процент ингибирования как ОП/ОП<sub>0</sub>·100%, где ОП- средняя оптическая плотность в лунках с данной концентрацией антитела, ОП<sub>0</sub>- средняя оптическая плотность в лунках без добавления ФНО- $\alpha$ , строили кривую титрования - зависимость степени ингибирования от концентрации антитела; по кривой титрования находили концентрацию антитела, соответствующую 50%-ному ингибированию. Эксперимент проводили в трех повторах для концентраций ФНО- $\alpha$  100 нг/мл и 20 нг/мл.

Зависимость степени ингибирования апоптоза в % от концентрации антител ФНО- $\alpha$  брали в концентрации 100 нг/мл, антитела титровали от концентрации 10 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля брали антитела против сальмонеллы (0% ингибирования), в качестве положительного - лунки без добавления ФНО- $\alpha$  (100% ингибирования). Находили концентрацию антител, соответствующую 50%-ному ингибированию.

Результаты по наиболее активным антителам TNF E2 и TNF F11 приведены в Таблице 3.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что наибольшей ингибирующей активностью обладают антитела TNF E2 и TNF F11. Эти антитела были взяты для дальнейшей работы по получению протеолитических Fab-фрагментов. Характеристика Fab-фрагментов антител TNF E2 и TNF F11 против ФНО- $\alpha$ , полученных методом ограниченного протеолиза, приведена в Таблице 4.

Пример 4. Исследование влияния антитела TNF E2 на экспрессию ICAM-1 на поверхности эмбриональных клеток человека

Эмбриональные клетки (ЭК) выделяли из пупочной вены человека и культивировали, проводя 2-3 пассажа, как описано ранее (Mazurov, A.V. A monoclonal antibody, VM64, reacts with a 130 kDa glycoprotein common to platelets and endothelial cells: heterogeneity in antibody binding to human aortic endothelial cells./ Mazurov AV, Vinogradov DV, Kabaeva NV, Antonova GN, Romanov YA, Vlasik TN, Antonov AS, Smirnov VN.// Thrombos. Haemostas., -1991,-V. 66, -P. 494-9). К ЭК добавляли ФНО- $\alpha$  в концентрации 100 ед/мл и антитела против ФНО- $\alpha$  в концентрации 1 мкг/мл или 10 мкг/мл и инкубировали в течение 5 часов или 20 часов. Затем ЭК промывали, фиксировали 0,02% параформальдегидом и окрашивали моноклональными антителами 10F3B2 против ICAM-1. Связывание регистрировали методом проточной цитофлюориметрии, используя программу CellQuest. В каждой пробе анализировали

по 10000 клеток. Для последующих расчетов экспрессии ICAM-1 определяли медиану для каждого пика гистограммы. Результаты экспериментов, в которых экспрессию ICAM-1 оценивали по медиане соответствующей гистограммы и в % от контроля (в присутствии ФНО- $\alpha$ , но без антител), представлены в Таблице 5.

Согласно приведенным данным антитело TNF E2 против ФНО- $\alpha$  обладает выраженной ингибирующей активностью, подавляя эффекты ФНО- $\alpha$ : индукцию апоптоза клеток L929 и индукцию экспрессии молекул адгезии ICAM-1 на поверхности ЭК человека.

Пример 5. Клонирование генов, кодирующих Fab фрагменты мышиноного моноклонального антитела TNF E2 против ФНО- $\alpha$ , используя мРНК из подходящих линий клеток в качестве матриц

Тотальная РНК была очищена из  $1 \times 10^7$  клеток подходящих гибридом, продуцирующих антитела согласно настоящему изобретению Mab анти TNF E2.

Клетки ( $10^7$  клеток) два раза промывали однократным буфером PBS. В пробирку со 100 мкл клеток добавляли 400 мкл раствора GTB (4 М гуанидинтиоцианат, 30 мМ цитрат натрия, 1% N-лаурилсаркозил натрия, 120 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол). Клетки суспендировали пипетированием в течение 2-3 минут и помещали на лед. Затем добавляли 50 мкл 3 М ацетата натрия (рН 5,2) и 500 мкл фенола, насыщенного водой, и полученную суспензию тщательно перемешивали на мешалке Vortex. Затем добавляли 100 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт и суспензию тщательно перемешивали на мешалке Vortex. Суспензию центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин и супернатант переносили в новую пробирку. Процедуру повторяли. Добавляли равный объем изопропанола (500 мкл) и хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . Образец центрифугировали при 12000 g в течение 10 минут, осадок промывали этанолом (70%) и растворяли в воде (50 мкл). Выделили в целом 7,5 мкг РНК (0,15 мкг/мкл), которые использовали для дальнейшего синтеза кДНК.

кДНК синтезировали с использованием набора RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) в соответствии с "протоколом синтеза кДНК, подходящего для ПЦР", рекомендованного производителем.

Дизайн праймеров для клонирования гена, кодирующего тяжелую цепь

Для того чтобы идентифицировать пару праймеров, пригодных для клонирования гена, кодирующего тяжелую цепь, проводили ПЦР для клонирования с использованием ДНК полимеразы Tag (реакционная смесь содержала 10X буфер для ДНК полимеразы Tag (67 мМ Tris-HCl (рН 8,8 при  $25^\circ\text{C}$ ), 166 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  100 мМ 2-меркаптоэтанол)+20 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1,25 мМ dNTP, 5'-концевой праймер (25 пмоль), 3'-концевой праймер (25 пмоль), ДНК полимеразы Taq (2.5 U), кДНК 1 мл, бидистиллированная вода до 50 мкл). Тотальную кДНК использовали в качестве матрицы. Программа ПЦР была следующей:  $95^\circ\text{C}$  в течение 3 минут; 35 циклов  $94^\circ\text{C}$  в течение 1 минуты,  $45^\circ\text{C}$  в течение 1 минуты и  $72^\circ\text{C}$  в течение 1 минуты; в конце  $72^\circ\text{C}$  в течение 10 минут.

5'-концевой праймер соответствовал набору из 16 дегенеративных праймеров (SEQ ID NO: 5-20), узнающих 95% последовательностей сигнальных пептидов в генах, кодирующих тяжелую цепь, выложенных в базе данных Кабат (Kabat, E., Wu, T., Perry, H. 1991. Sequences of proteins of Immunological Interest, 5th edn. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH). В качестве 3'-концевого праймера в ПЦР использовали праймер, комплементарный участку, кодирующему аминокислоты 141-147 СН1 домена тяжелой цепи IgG, с введенным сайтом Sail: A12 (SEQ ID NO: 48). С использованием электрофореза продуктов ПЦР было показано,

что использование единственной пары праймеров B6 и A12 (SEQ ID NO: 14 и 48) приводило к появлению фрагмента ПЦР. Размер полученного продукта ПЦР ( $\approx 500$  пар оснований) находился в хорошем соответствии с предсказанной последовательностью кДНК гена тяжелой цепи IgGMus musculus из баз данных Gene-Bank и IMGT-GENE-DB.

Дизайн праймеров для клонирования гена, кодирующего легкую цепь. Ранее было показано, что изучаемое антитело содержит легкую цепь типа каппа. На основании этих данных в качестве 5'-концевого праймера использовали набор из 23 дегенеративных праймеров (SEQ ID NO: 22 - 44). Этот набор узнает 95% последовательностей, соответствующих сигнальным пептидам в генах, кодирующих каппа цепь, опубликованных в базе данных Кабат (Kabat, E., Wu, T., Popy, H. 1991. Sequences of proteins of Immunological Interest, 5th edn. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH). В качестве 3'-концевого праймера в ПЦР, соответствовавшего 3'-концу легкой цепи фрагмента Fab (каппа-тип), с введенным на 5'-конец сайтом XhoI использовали праймер L-m-г (SEQ ID NO: 45). С использованием электрофореза продуктов ПЦР было показано, что использование единственной пары праймеров A15 и L-m-г (SEQ ID NO: 22 и 45) приводило к появлению фрагмента ПЦР. Размер полученного продукта ПЦР ( $\approx 700$  пар оснований) находился в хорошем соответствии с предсказанной последовательностью кДНК гена легкой цепи IgGMus musculus из баз данных Gene-Bank и IMGT-GENE-DB.

Клонирование генов, кодирующих Fab фрагменты антител против ФНО- $\alpha$

Pfu ДНК полимеразу (Fermentas) использовали для клонирования генов, кодирующих цепи антитела. Условия ПЦР оптимизировали подбором температуры отжига и концентрации  $Mg^{2+}$  (реакционная смесь содержала 10X буфер для Pfu ДНК полимеразы (200 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 100 мМ  $(NH_4)_2SO_4$  100 мМ KCl, 1% Тритон X-100, 1 мг/мл БСА)+20 мМ  $MgCl_2$ , 1,25 мМ dNTP, 5'-концевой праймер (25 пмоль), 3'-концевой праймер (25 пмоль), Pfu ДНК полимеразы (1,25 U), кДНК 1 мкл, бидистиллированная вода до 50 мкл). Каждый их продуктов двух независимых ПЦР элюировали из агарозного геля и фосфорилировали с использованием T4 ДНК полинуклеотидкиназы. Программа для ПЦР была следующая: 95°C в течение 3 минут; 35 циклов 94°C в течение 1 минуты, 45°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 2 минут; в конце 72°C в течение 10 минут. Полученные фрагменты клонировали в плазмидный вектор pUC18, линейризованный рестриктазой Smol. Рекомбинантные плазмиды, содержащие гены тяжелой и легкой цепей Fab указанного антитела, выделяли и назвали pUC18-TNF-E2-H и pUC18-TNF-E2-L соответственно.

Пример 6. Клонирование генов, кодирующих Fab фрагменты мышиноного моноклонального антитела TNF F11 против ФНО- $\alpha$ , используя мРНК из подходящих линий клеток в качестве матриц

Тотальная РНК была очищена из  $1 \times 10^7$  клеток подходящих гибридом, продуцирующих антитела согласно настоящему изобретению. Клетки ( $10^7$  клеток) два раза промывали однократным буфером PBS. В пробирку со 100 мкл клеток добавляли 400 мкл раствора GTB (4 М гуанидинтиоцианат, 30 мМ цитрат натрия, 1% N-лаурилсаркозил натрия, 120 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол). Клетки суспендировали пилотированием в течение 2-3 минут и помещали на лед. Затем добавляли 50 мкл 3 М ацетата натрия (pH 5,2) и 500 мкл фенола, насыщенного водой, и полученную суспензию тщательно перемешивали на мешалке Vortex. Затем добавляли 100 мкл смеси хлороформ - изоамиловый спирт и суспензию тщательно перемешивали на мешалке Vortex. Суспензию центрифугировали в течение 10 мин и супернатант

переносили в новую пробирку. Процедуру повторяли. Добавляли равный объем изопропанола (500 мкл) и хранили при -20°C. Образец центрифугировали в течение 10 минут, осадок промывали этанолом (70%) и растворяли в воде (50 мкл). Выделили в целом 50 мкг РНК (1,0 мкг/мкл), которые использовали для дальнейшего синтеза кДНК.

кДНК синтезировали с использованием набора RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) в соответствии с "протоколом синтеза кДНК, подходящего для ПЦР", рекомендованного производителем.

Дизайн праймеров для клонирования гена, кодирующего тяжелую цепь.

Для того чтобы идентифицировать пару праймеров, пригодных для клонирования гена, кодирующего тяжелую цепь, проводили ПЦР для клонирования с использованием ДНК полимеразы Tag (реакционная смесь содержала 10X буфер для ДНК полимеразы Tag (67 mM Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 166 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM 2-меркаптоэтанола)+20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 mM dNTP, 5'-концевой праймер (25 пмоль), 3'-концевой праймер (25 пмоль), ДНК полимеразы Taq (2.5 U), кДНК 1 мл, бидистиллированная вода до 50 мкл). Тотальную кДНК использовали в качестве матрицы. Программа ПЦР была следующей: 95°C в течение 3 минут; 35 циклов 94°C в течение 1 минуты, 45°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 1 минуты; в конце 72°C в течение 10 минут.

5'-Концевой праймер соответствовал набору из 16 дегенеративных праймеров (SEQ ID NO: 5-20), узнающих 95% последовательностей сигнальных пептидов в генах, кодирующих тяжелую цепь, выложенных в базе данных Кабат (Kabat, E., Wu, T., Penu, H. 1991. Sequences of proteins of Immunological Interest, 5th edn. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH). В качестве 3'-концевого праймера в ПЦР, соответствовавшего 3'-концу тяжелой цепи фрагмента Fab (IgG1), с введенным на 5'-конец сайтом XhoI использовали праймер A26 (SEQ ID NO: 21). С использованием электрофореза продуктов ПЦР было показано, что использование единственной пары праймеров A7 и A26 (SEQ ID NO: 9 и 21) приводило к появлению фрагмента ПЦР. Размер полученного продукта ПЦР (~700 пар оснований) находился в хорошем соответствии с предсказанной последовательностью кДНК гена тяжелой цепи IgGMus musculus из баз данных Gene-Bank и IMGT-GENE-DB.

Дизайн праймеров для клонирования гена, кодирующего легкую цепь

Ранее было показано, что изучаемое антитело содержит легкую цепь типа каппа. На основании этих данных в качестве 5'-концевого праймера использовали набор из 23 дегенеративных праймеров (SEQ ID NO: 22-44). Этот набор узнает 95% последовательностей, соответствующих сигнальным пептидам в генах, кодирующих каппа цепь, опубликованных в базе данных Кабат (Kabat, E., Wu, T., Penu, H. 1991. Sequences of proteins of Immunological Interest, 5th edn. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH). В качестве 3'-концевого праймера в ПЦР, соответствовавшего 3'-концу легкой цепи фрагмента Fab (каппа-тип), с введенным на 5'-конец сайтом XhoI, использовали праймер L-m-r (SEQ ID NO: 45). С использованием электрофореза продуктов ПЦР было показано, что использование единственной пары праймеров A19 и L-m-r (SEQ ID NO: 26 и 45) приводило к появлению фрагмента ПЦР. Размер полученного продукта ПЦР (~700 пар оснований) находился в хорошем соответствии с предсказанной последовательностью кДНК гена легкой цепи IgGMus musculus из баз данных Gene-Bank и IMGT-GENE-DB.

Клонирование генов, кодирующих Fab фрагменты антител против ФНО-α  
Pfu ДНК полимеразу (Fermentas) использовали для клонирования генов,

кодирующих цепи антитела. Условия ПЦР оптимизировали подбором температуры отжига и концентрации  $Mg^{2+}$  (реакционная смесь содержала 10X буфер для Pfu ДНК полимеразы (200 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 100 мМ  $(NH_4)_2SO_4$  100 мМ KCl, 1% Тритон X-100, 1 мг/мл БСА)+20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,25 мМ dNTP, 5'-концевой праймер (25 пмоль), 3'-концевой праймер (25 пмоль), Pfu ДНК полимеразы (1,25 U), кДНК 1 мкл, бидистиллированная вода до 50 мкл). Каждый их продуктов двух независимых ПЦР элюировали из агарозного геля и фосфорилировали с использованием T4 ДНК полинуклеотидкиназы. Программа для ПЦР была следующая: 95°C в течение 3 минут; 35 циклов 94°C в течение 1 минуты, 45°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 2 минут; в конце 72°C в течение 10 минут. Полученные фрагменты клонировали в плазмидный вектор pUC18, линейаризованный рестриктазой SmaI. Рекомбинантные плазмиды, содержащие гены тяжелой и легкой цепей Fab указанного антитела, выделяли и назвали pUC 18-TNF-F11-H и pUC 18-TNF-F11-L соответственно.

Пример 7. Секвенирование фрагментов генов, кодирующих переменные части Fab-фрагмента мышинового моноклонального антитела против ФНО-α человека.

Рекомбинантные плазмиды pUC18-TNF-E2-H, содержащую независимый фрагмент ПЦР, кодирующий тяжелую цепь антитела TNF-E2 против ФНО-α; pUC18-TNF-E2-L, содержащую независимый фрагмент ПЦР, кодирующий легкую цепь антитела TNF-E2 против ФНО-α; pUC 18-TNF-F 11-H, содержащую независимый фрагмент ПЦР, кодирующий тяжелую цепь антитела TNF-F11 против ФНО-α; и pUC 18-TNF-F 11-L, содержащую независимый фрагмент ПЦР, кодирующий легкую цепь антитела TNF-F11 против ФНО-α, выделяли и фрагменты ПЦР секвенировали в обоих направлениях.

Использовали стандартные праймеры для секвенирования SEQ ID NO: 46 и 47.

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи мышинового антитела E2 против ФНО-α человек приведена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 1.

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи мышинового антитела E2 против ФНО-α человек приведена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 2.

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи мышинового антитела F 11 против ФНО-α человек приведена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 3.

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи мышинового антитела F11 против ФНО-α человек приведена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 4.

Хотя настоящее изобретение было подробно описано со ссылкой на предпочтительные варианты его осуществления, для специалиста в данной области техники ясно, что могут быть сделаны различные замены и применены эквиваленты, которые не выходят за рамки настоящего изобретения. Все процитированные здесь документы являются частью настоящей заявки, включенные путем ссылки.

Таблица 1		
Антитела против ФНО-α		
Иммуноген	Название клона	Субзотип
Рекомбинантный ФНО-α	TNFE 2 TNFF 11	IgG2b IgG1

Таблица 2
Характеристики моноклональных антител против ФНО-α в сравнении с антителом infliximab.

Название клона	Конечная точка титрования антител в непрямом ИФА, нг/мл	Конечная точка титрования ФНО-α в ИФА с биотинилированным ФНО-α, нг/мл	Константа связывания с ФНО-α, М	Способность антитела взаимодействовать с ФНО-α в Вестерн блоте
TNFE2	0,3	3	$5,2 \times 10^{-9}$	+
TNFF11	0,3	0,1	$2,3 \times 10^{-8}$	+
infliximab	Н.о.	0,3	$8 \times 10^{-9}$	+

Таблица 3

Ингибирующая активность антител против ФНО-α, определенная в реакции ингибирования ФНО-α -опосредованного апоптоза и выраженная через IC<sub>50</sub> (концентрация антитела, способная на 50% ингибировать действие 20нг/мл или 100 нг/мл ФНО-α). Cat/Сфно - отношение молярной концентрации антитела, обладающей 50%-ной ингибирующей активностью, к молярной концентрации ФНО-α, взятой для эксперимента.

МоАг	IC <sub>50</sub> , мМ, для 20 нг/мл ФНО-α	IC <sub>50</sub> , мМ, для 100 нг/мл ФНО-α	Cat/Сфно
TNFE2	0,81	2,3	0,391
TNFF11	0,62	4,2	0,714
infliximab	0,27	1,6	0,272

Таблица 4

Характеристика Fab-фрагментов антител против ФНО-α: TNF E2, TNF H3 и TNF F11

Название Fab-фрагмента	Kd, М	IC <sub>50</sub> , мМ, для 20нг/мл ФНО-α	IC <sub>50</sub> , мМ, для 100 нг/мл ФНО-α
TNF E2 Fab	$4,5 \times 10^{-9}$	79,2	186
TNF F11 Fab	$2,1 \times 10^{-8}$	29	74

Таблица 5

Влияние антитела TNF-E2 и антитела infliximab на экспрессию ICAM-1 на поверхности ЭК, стимулированную фактором некроза опухолей (ФНО-α)

№*	Метод	Условия инкубации с ФНО-α	Антитело	Экспрессия ICAM-1	Эффект ФНО-α
				Медиана	%**
1	10F3B2+ФИТЦ-анти-IgG мыши	Без ФНО-α	Без антител	67	-
		+ФНО-α 100 ед/мл, 5 час	Без антител	649	100
			+TNF-E2, 1 мкг/мл	91	4
			+TNF-E2, 10 мкг/мл	96	5
			+infliximab, 1 мкг/мл	87	3
			+infliximab, 10 мкг/мл	83	3
2	Биотин-10F3B2+РегСР-стрептавидин	Без ФНО-α	Без антител	42	-
		+ФНО-α 100 ед/мл, 20 час	Без антител	346	100
			+TNF-E2, 1 мкг/мл	192	49
			+TNF-E2, 10 мкг/мл	97	18
			+infliximab, 1 мкг/мл	78	12
			+infliximab, 10 мкг/мл	68	9
			+CRC64***, 10 мкг/мл	327	94

\*Для экспериментов 1 приведены результаты одного измерения для эксперимента 2 - средние из двух измерений.

\*\*Эффект ФНО-α в % рассчитывали по формуле [медиана (+ФНО-α, +антитело) - медиана (-ФНО-α, -антитело)] / [медиана (+ФНО-α, -антитело) - медиана (-ФНО-α, -антитело)]×100. Таким образом, за 100% (эффект ФНО без добавления антител) принимали различие между экспрессией ICAM-1, выраженной в медианах, в отсутствие и в присутствии ФНО-α в образцах без антител.

\*\*\* CRC64 - контрольное антитело, не взаимодействующее ни с ФНО-α, ни с ЭК, ни с ICAM-1.

## Формула изобретения

- 5 1. Вариабельный домен тяжелой цепи (VH) мышиноного антитела против фактора некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ) человека, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.
2. Вариабельный домен легкой цепи (VL) мышиноного антитела против ФНО- $\alpha$  человека, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.
- 10 3. Антигенсвязывающий фрагмент (Fab), селективно связывающийся с ФНО- $\alpha$  человека и нейтрализующий его, который включает в себя вариабельный домен тяжелой цепи (VH) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1 и вариабельный домен легкой цепи (VL) с последовательностью аминокислот SEQ IS NO: 2 или вариабельный домен тяжелой цепи (VH) с последовательностью аминокислот SEQ ID  
15 NO: 3 и вариабельный домен легкой цепи (VL) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50