



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.12.16

(21) Номер заявки

201892090

(22) Дата подачи заявки

2017.03.16

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

(54) АНТИТЕЛА К ФНО $\alpha$  И ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ФРАГМЕНТЫ

(31) 16160923.5

(32) 2016.03.17

(33) EP

(43) 2019.02.28

(86) PCT/EP2017/056227

(87) WO 2017/158084 2017.09.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

НУМАБ ИННОВЕЙШН АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Гунде Теа, Мэйер Себастьян (CH)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(56) EP-A1-2623515

WO-A2-2012007880

WO-A1-2015144852

WO-A1-2015065987

MARIA WIEKOWSKI ET AL.: "Infliximab (Remicade)", HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES, WILEY-VCH, WEINHEIM, PAGE(S) 885 - 904 1 January 2007 (2007-01-01), XP002720018, ISBN: 978-3-527-31453-9 Retrieved from the Internet: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527619740.ch34/pdf> [retrieved on 2014-02-10] page 885 - page 898

HARTMUT KUPPER ET AL.: "Adalimumab (Humira)", HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES, WILEY-VCH, WEINHEIM, PAGE(S) 697 - 732 1 January 2007 (2007-01-01), XP002720017, ISBN: 978-3-527-31453-9 Retrieved from the Internet: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527>

619740.ch27/pdf [retrieved on 2014-02-10] page 697 - page 727

MELMED GIL Y. ET AL.: "Certolizumab pegol", NATURE REVIEWS. DRUG DISCOVERY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 7, no. 8, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 641-642, XP009147828, ISSN: 1474-1784, DOI: 10.1038/NRD2654 page 641 - page 642; figure 1

MAZUMDAR SOHINI ET AL.: "Golimumab", MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 1, no. 5, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 422-431, XP002631538, ISSN: 1942-0870 page 422 - page 431

"CDP 571: anti-TNF monoclonal antibody, BAY 103356, BAY W 3356, Humicade", DRUGS IN R & D, ADIS INTERNATIONAL, AUCKLAND, NZ, vol. 4, no. 3, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 174-178, XP009176085, ISSN: 1174-5886 page 174 - page 178

STEPHAN DUEBEL ED - STEFAN DÜBEL: "Handbook of Therapeutic Antibodies Chapter 6", 1 January 2007 (2007-01-01), HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES, WILEY-VCH, WEINHEIM, PAGE(S) 119 - 144, XP007913671, ISBN: 978-3-527-31453-9 in particular section 6.4.4

GERSHONI JONATHAN M. ET AL.: "Epitope mapping - The first step in developing epitope-based vaccines", BIODRUGS, ADIS INTERNATIONAL LTD, NZ, vol. 21, no. 3, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 145-156, XP009103541, ISSN: 1173-8804, DOI: 10.2165/00063030-200721030-00002 pages 148-149

TRACEY ET AL.: "Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review", PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, ELSEVIER, GB, vol. 117, no. 2, 26 October 2007 (2007-10-26), pages 244-279, XP022432143, ISSN: 0163-7258, DOI: 10.1016/J.PHARMTHERA.2007.10.001 entire document, in particular abstract tables 1 and 2

(57) Данное изобретение относится к молекулам антител и их функциональным фрагментам, способным связываться с фактором некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ). Указанное антитело или его фрагмент содержат домен V<sub>L</sub>, содержащий CDR1 последовательности SEQ ID NO: 1, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 2 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 3, и домен V<sub>H</sub>, содержащий CDR1 последовательности SEQ ID NO: 4, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 6. Данные молекулы характеризуются (i) высокой аффинностью к ФНО $\alpha$  человека, (ii) высокой способностью подавлять индуцированный ФНО $\alpha$  апоптоз в клетках, (iii) существенную аффинностью к ФНО $\alpha$  яванского макака и макака-резуса и (iv) высокой температурой плавления варибельного домена. Изобретение также относится к способу получения антитела или его фрагмента и к их терапевтическому применению в лечении связанных с ФНО $\alpha$  воспалительных расстройств.

### Область техники

Данное изобретение относится к молекулам антител и их функциональным фрагментам, способным связываться с фактором некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ), способам их получения и их терапевтическому применению.

### Уровень техники

ФНО $\alpha$  представляет собой гомотримерный провоспалительный цитокин, который высвобождается клетками иммунной системы и взаимодействует с ними. Также была продемонстрирована положительная регуляция ФНО $\alpha$  при многих заболеваниях человека, включая хронические заболевания, такие как ревматоидный артрит, болезнь Крона, язвенный колит и рассеянный склероз.

Антитела к ФНО $\alpha$  были предложены для профилактики и лечения эндотоксического шока (Beutler et al., *Science*, 234, 470-474, 1985). В источниках Bodmer et al. (*Critical Care Medicine*, 21, S441-S446, 1993) и Wherry et al. (*Critical Care Medicine*, 21, S436-S440, 1993) раскрывается терапевтический потенциал антител к ФНО $\alpha$  при лечении септического шока. Применение антител к ФНО $\alpha$  при лечении септического шока также обсуждается в источнике Kirschenbaum et al. (*Critical Care Medicine*, 26, 1625-1626, 1998). С применением моноклонального антитела к ФНО $\alpha$  может быть эффективно осуществлено лечение коллаген-индуцированного артрита (Williams et al. (*PNAS-USA*, 89, 9784-9788, 1992)).

Применение антител к ФНО $\alpha$  при лечении ревматоидного артрита и болезни Крона описано в источниках Feldman et al. (*Transplantation Proceedings*, 30, 4126-4127, 1998), Adorini et al. (*Trends in Immunology Today*, 18, 209-211, 1997) и Feldman et al. (*Advances in Immunology*, 64, 283-350, 1997). Антитела к ФНО $\alpha$ , применяемые ранее при таком лечении, как правило, представляют собой химерные антитела, такие как описано в патенте США № 5919452.

Моноклональные антитела к ФНО $\alpha$  описаны в уровне техники. В источнике Meager et al. (*Hybridoma*, 6, 305-311, 1987) описаны моноклональные антитела мыши к рекомбинантному ФНО $\alpha$ . В источнике Fendly et al. (*Hybridoma*, 6, 359-370, 1987) описано применение моноклональных антител мыши к рекомбинантному ФНО $\alpha$  при определении нейтрализующих эпитопов ФНО. Кроме того, в международной патентной заявке WO 92/11383 раскрыты рекомбинантные антитела, включая CDR-привитые антитела, специфичные к ФНО $\alpha$ . В источнике Rankin et al. (*British J. Rheumatology*, 34, 334-342, 1995) описано применение таких CDR-привитых антител при лечении ревматоидного артрита. В патенте США № 5919452 раскрыты химерные антитела к ФНО $\alpha$  и их применение при лечении патологий, связанных с присутствием ФНО $\alpha$ . Дополнительно антитела к ФНО $\alpha$  раскрыты в источнике Stephens et al. (*Immunology*, 85, 668-674, 1995), *Drugs in R&D*, Vol. 4 No. 3, 2003, p. 174-178, EP2623515 A1, WO 2012/007880 A2, WO 2015/144852 A1, WO 2015/065987 A1, GB-A-2246570, GB-A-2297145, US 8673310, US 2014/0193400, EP 2390267 B1, US 8293235, US 8697074, WO 2009/155723 A2 и WO 2006/131013 A2.

Молекулы рекомбинантных антител к ФНО $\alpha$ , известные из уровня техники, в целом имеют пониженную аффинность к ФНО $\alpha$  по сравнению с антителами, из которых получают гипервариабельные участки или CDR. Все доступные в настоящее время на рынке ингибиторы ФНО $\alpha$  вводят внутривенно или подкожно с недельными или более длительными интервалами в виде болюсных инъекций, в результате получают высокие исходные концентрации, которые постепенно снижаются до следующей инъекции.

Одобренные к применению в настоящее время биотерапевтические средства, нацеленные на ФНО $\alpha$ , включают (i) инфликсимаб, химерное моноклональное антитело, содержащее фрагмент IgG человека (Remicade®; Wiekowski M et al: "Infliximab (Remicade)", *Handbook of Therapeutic Antibodies*, WILEY-VCH; Weinheim, 2007-01-01, p.885-904); (ii) этанерцепт, димерный гибридный белок TNFR2 и Fc IgG1 (Энбрел (Enbrel®)); (iii) адалимумаб, полностью человеческое моноклональное антитело (mAT) (Humira®; Kupper H et al: "Adalimumab (Humira)", *Handbook of Therapeutic Antibodies*, WILEY-VCH; Weinheim, 2007-01-01, p.697-732), (iv) цертолизумаб, пегилированный Fab-фрагмент (Cimzia®; Melmed G Y et al: "Certolizumab pegol", *Nature Reviews. Drug Discovery*, Nature Publishing Group, GB, Vol. 7, No. 8, 2008-08-01, p.641-642); (v) голимумаб, моноклональное антитело IgG1K человека (Simponi®; Mazumdar S et al: "Golimumab", *mAbs*, Landes Bioscience, US, Vol. 1, No. 5, 2009-09-01, p.422-431). При этом разрабатываются различные биоэквивалентные лекарственные средства, и миметик инфликсимаба, известный как Ремсима (Remsima), уже одобрен к применению в Европе.

Инфликсимаб обладает относительно низкой аффинностью к ФНО $\alpha$  ( $K_D > 0,2$  нМ; Weir et al., 2006, *Therapy* 3: 535) и ограниченной нейтрализующей способностью в анализе с L929. Помимо этого, инфликсимаб демонстрирует по существу отсутствие перекрестной реактивности с ФНО $\alpha$  яванских макаков (*Супомолгус*) или макаков-резусов (*Rhesus*). Тем не менее, для антител к ФНО $\alpha$  перекрестная реактивность с ФНО $\alpha$  от обезьян весьма желательна, поскольку это позволяет проводить исследования на животных-приматах, что во многих аспектах отражает ситуацию у людей.

Этанерцепт, хотя и является бивалентной молекулой, связывается с ФНО $\alpha$  в отношении один тример на одну молекулу этанерцепта, исключая образование крупных комплексов антиген-биотерапевтическое средство (Wallis, 2008, *Lancet Infect Dis* 8: 601). Он не подавляет индуцированную липополисахаридами (ЛПС) секрецию цитокинов моноцитами (Kirchner et al., 2004, *Cytokine* 28: 67).

Активность адалимумаба аналогична активности инфликсимаба. Другим недостатком адалимумаба является его невысокая стабильность, например, при определении в анализе тепловой денатурации. Было определено, что температура плавления ( $T_{пл}$ ) адалимумаба в таком анализе составляет  $67,5^{\circ}\text{C}$ . Однако, чем ниже значение  $T_{пл}$  антитела, тем ниже его общая стабильность. Более низкая  $T_{пл}$  делает антитела менее подходящими для фармацевтического применения, например, для перорального введения.

Активность цертолизумаба немного выше, чем активность инфликсимаба, но все еще не является удовлетворительной. Цертолизумаб не подавляет пролиферацию Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) (Vos et al., 2011, *Gastroenterology* 140: 221).

В источнике Saldanha J W et al: "Molecular Engineering I: Humanization", Handbook of Therapeutic Antibodies, Chapter 6, 2007-01-01, WILEY-VCH, Weinheim, p. 119-144 раскрыты различные стратегии гуманизации моноклональных антител, включая пересадку CDR, изменение поверхности/рекомбинацию поверхностных остатков, перенос SDR и технологию деиммунизации.

Существует потребность в улучшенных молекулах антител для лечения хронических воспалительных заболеваний, таких как воспалительные расстройства кишечника. Молекулы антител должны иметь по меньшей мере (i) высокую аффинность к ФНО $\alpha$  человека (то есть  $K_D < 200$  пМ), (ii) высокую способность подавлять индуцированный ФНО $\alpha$  апоптоз в клетках L929, (iii) существенную аффинность к ФНО $\alpha$  яванского макака и макака-резуса (например,  $K_D < 2$  нМ) и (iv) высокую температуру плавления варибельного домена при определении в эксперименте по тепловой денатурации (например,  $T_{пл} > 70^{\circ}\text{C}$ ).

### Сущность изобретения

Авторы изобретения, предложенного в данной заявке, обнаружили, что некоторые антитела к ФНО $\alpha$  и их функциональные фрагменты проявляют комбинацию благоприятных свойств, включая высокую аффинность к ФНО $\alpha$  человека ( $K_D < 200$  пМ), более высокую по сравнению с инфликсимабом способность подавлять индуцированный ФНО $\alpha$  апоптоз в клетках L929 и существенную аффинность ( $K_D < 2$  нМ) к ФНО $\alpha$  животных, таких как яванский макак (*Macaca fascicularis*) и/или макак-резус (*Macaca mulatta*). Помимо этого, указанные антитела и их функциональные фрагменты были специфичными для ФНО $\alpha$ , поскольку они в значительной степени не связывались с ФНО $\beta$ , и проявляют значительную стабильность при определении в анализе тепловой денатурации варибельного домена.

В данном изобретении предложены молекулы антител и их функциональные фрагменты.

Таким образом, данное изобретение относится к объектам, определенным в следующих пунктах (1)-(47):

(1) Антитело или его функциональный фрагмент, способное связываться с фактором некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ) человека, причем указанное антитело или его функциональный фрагмент содержит (i) домен  $V_L$ , содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и (ii) домен  $V_H$ , содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

(2) Антитело или функциональный фрагмент по п. (1), причем указанное антитело или функциональный фрагмент содержит (i) домен  $V_L$ , содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и (ii) домен  $V_H$ , содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

(3) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, причем указанное антитело или функциональный фрагмент содержит домен  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 17, предпочтительно имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

(4) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, причем указанное антитело или функциональный фрагмент содержит домен  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 16, предпочтительно имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

(5) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, причем указанное антитело или его функциональный фрагмент специфически связывается с ФНО $\alpha$  человека.

(6) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, причем указанное антитело или его функциональный фрагмент в значительной степени не связывается с ФНО $\beta$ .

(7) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, причем указанное антитело или функциональный фрагмент

- (i) связывается с ФНО $\alpha$  человека с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее 200 пМ;
- (ii) обладает перекрестной реактивностью с ФНО $\alpha$  *Macaca mulatta* и ФНО $\alpha$  *Macaca fascicularis*;
- (iii) обладает более высокой активностью, чем инфликсимаб, при определении с помощью анализа с L929 и/или
  - (iv) способен связываться с ФНО $\alpha_{\text{Тример}}$  человека в стехиометрическом отношении (антитело : ФНО $\alpha_{\text{Тример}}$ ), составляющем по меньшей мере 2.
- (8) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с ФНО $\alpha$  человека с  $K_D$  менее 180 пМ.
- (9) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с ФНО $\alpha$  *Macaca mulatta* с  $K_D$  менее 2 нМ.
- (10) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с ФНО $\alpha$  *Macaca fascicularis* с  $K_D$  менее 2 нМ.
- (11) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где способность указанного антитела или функционального фрагмента подавлять индуцированный ФНО $\alpha$  апоптоз по отношению к способности инфликсимаба (относительная способность), определенной в анализе с L929, составляет более 1,5, и причем указанная относительная способность представляет собой отношение значения  $IC_{50}$  в нг/мл инфликсимаба в анализе с L929 к значению  $IC_{50}$  в нг/мл антитела в форме scFv в анализе с L929.
- (12) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где температура плавления вариабельного домена антитела в виде scFv, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, составляет по меньшей мере 70°C.
- (13) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где температура плавления вариабельного домена антитела в виде scFv, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, составляет по меньшей мере 75°C.
- (14) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где температура плавления, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, составляет по меньшей мере 80°C.
- (15) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где потеря содержания мономера после пяти последовательных циклов замораживания-оттаивания составляет менее 0,2%.
- (16) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где потеря содержания мономера после хранения при 4°C в течение четырех недель составляет менее 3%.
- (17) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где способность антитела или функционального фрагмента блокировать взаимодействие ФНО $\alpha$  человека с рецептором ФНО I (TNFRI) по отношению к способности инфликсимаба (относительная способность) при определении с помощью ингибиторного ИФА составляет более 1, причем указанная относительная способность представляет собой отношение значения  $IC_{50}$  в нг/мл инфликсимаба к значению  $IC_{50}$  в нг/мл антитела в форме scFv.
- (18) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где способность антитела или функционального фрагмента блокировать взаимодействие ФНО $\alpha$  человека с рецептором ФНО II (TNFRII) по отношению к способности инфликсимаба (относительная способность) при определении с помощью ингибиторного ИФА составляет более 1, причем указанная относительная способность представляет собой отношение значения  $IC_{50}$  в нг/мл инфликсимаба к значению  $IC_{50}$  в нг/мл антитела в форме scFv.
- (19) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, способное подавлять клеточную пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови в реакции смешанной культуры лимфоцитов.
- (20) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, способное подавлять индуцированную ЛПС секрецию интерлейкина-1 $\beta$  CD14<sup>+</sup> моноцитами.
- (21) Антитело или функциональный фрагмент по п. (20), где значение  $IC_{50}$  для подавления индуцированной ЛПС секреции интерлейкина-1 $\beta$  составляет менее 1 нМ.
- (22) Антитело или функциональный фрагмент по п. (21), где значение  $IC_{50}$  для подавления индуцированной ЛПС секреции интерлейкина-1 $\beta$ , рассчитанное в виде молярной концентрации, меньше, чем значение  $IC_{50}$  адалимумаба.
- (23) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, способное подавлять индуцированную ЛПС секрецию ФНО $\alpha$  CD14<sup>+</sup> моноцитами.
- (24) Антитело или функциональный фрагмент по п. (23), где значение  $IC_{50}$  для подавления индуцированной ЛПС секреции ФНО $\alpha$  составляет менее 1 нМ.
- (25) Антитело или функциональный фрагмент по п. (24), где значение  $IC_{50}$  для подавления индуцированной ЛПС секреции ФНО $\alpha$ , рассчитанное в виде молярной концентрации, меньше, чем значение  $IC_{50}$  адалимумаба.

(26) Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое представляет собой иммуноглобулин G (IgG).

(27) Функциональный фрагмент по любому из пп. (1)-(25), который представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

(28) Функциональный фрагмент по п. (27), причем указанный scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 18, или состоит из указанной аминокислотной последовательности, предпочтительно указанный scFv содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или состоит из указанной аминокислотной последовательности.

(29) Функциональный фрагмент по любому из пп. (1)-(25), который представляет собой диатело.

(30) Антитело или его функциональный фрагмент, которое связывается с по существу тем же эпитопом ФНО $\alpha$  человека, что и антитело, содержащее домен V<sub>H</sub>, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и домен V<sub>L</sub>, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, в частности, причем указанное антитело или функциональный фрагмент демонстрирует один или более признаков, упомянутых выше в пп.1-29.

(31) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где сумма (i) количества аминокислот в каркасных участках I-III вариабельного домена легкой цепи указанного антитела или функционального фрагмента, которые отличаются от соответствующих консенсусных последовательностей V<sub>κ</sub>1 человека с SEQ ID NOs: 21-23 (см. табл. 10), и (ii) количества аминокислот в каркасном участке IV вариабельного домена легкой цепи указанного антитела или функционального фрагмента, которые отличаются от наиболее схожей последовательности основанной на последовательности  $\lambda$  зародышевой линии человека, выбранной из SEQ ID NOs: 24-27 (см. табл. 11), составляет менее 7, предпочтительно менее 4.

(32) Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, причем указанные каркасные участки I-III вариабельного домена легкой цепи указанного антитела или функционального фрагмента состоят из консенсусных последовательностей V<sub>κ</sub>1 человека с SEQ ID NOs:21-23, соответственно, а каркасный участок IV состоит из последовательности основанной на последовательности  $\lambda$  зародышевой линии человека, выбранной из SEQ ID NOs: 24-27.

(33) Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов.

(34) Вектор или плаزمид, содержащие нуклеиновую кислоту по п. (33).

(35) Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. (33) или вектор или плазмиду по п. (34).

(36) Способ получения антитела или функционального фрагмента по любому из пп (1)-(32), включающий культивирование клетки по п. (35) в среде при условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей указанное антитело или функциональный фрагмент, и выделение антитела или функционального фрагмента из указанных клеток или среды.

(37) Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или функциональный фрагмент по любому из пп. (1)-(32), и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

(38) Антитело или функциональный фрагмент согласно определению в любом из пп. (1)-(32) для применения в способе лечения воспалительного расстройства или связанного с ФНО $\alpha$  расстройства.

(39) Антитело или функциональный фрагмент для применения в соответствии с п. (38), причем указанное воспалительное расстройство или связанное с ФНО $\alpha$  расстройство выбрано из перечня заболеваний и расстройств, перечисленных ниже в разделе "Расстройства, подлежащие лечению".

(40) Антитело или функциональный фрагмент для применения в соответствии с п. (38), причем указанное воспалительное расстройство представляет собой воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта.

(41) Антитело или функциональный фрагмент для применения в соответствии с п. (40), причем указанное воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

(42) Антитело или функциональный фрагмент для применения в соответствии с п.

(40) или (41), причем указанное воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта представляет собой болезнь Крона.

(43) Антитело или функциональный фрагмент для применения в соответствии с п (42), причем указанная болезнь Крона выбрана из группы, состоящей из болезни Крона с поражением подвздошной кишки, толстого кишечника, подвздошной кишки и толстого кишечника и/или болезни Крона с изолированным поражением верхних отделов (желудка, двенадцатиперстной кишки и/или тощей кишки) и включающей нестриктурирующий/непенетрирующий, стриктурирующий, пенетрирующий и включающий перианальные поражения характер течения заболевания, с возможностью любой комбинации локализации и характера течения заболевания из указанных выше.

(44) Антитело или функциональный фрагмент для применения в соответствии с п. (40) или (41),

причем указанное воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта представляет собой язвенный колит.

(45) Антитело или функциональный фрагмент для применения в соответствии с п. (44), причем указанный язвенный колит выбран из группы, состоящей из язвенного проктита, проктосигмоидита, левостороннего колита, язвенного панколита и паучита.

(46) Антитело или функциональный фрагмент для применения в соответствии с п. (40) или (41), причем указанное воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта представляет собой микроскопический колит.

(47) Антитело или функциональный фрагмент для применения в соответствии с любым из пп. (38)-(46), причем указанный способ включает пероральное введение антитела или функционального фрагмента субъекту.

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1 - схематическое представление процесса гуманизации.

Фиг. 2 - хроматограммы эксклюзионной ВЭЖХ (SE-HPLC) очищенных препаратов гуманизованных scFv. Мономерный scFv элюируется с временами удерживания от 9 до 10 мин, в то время как компоненты буфера элюируются >10,4 мин. Все пики мертвого объема колонки до соответствующего мономерному scFv объединяли как агрегаты/олигомеры и использовали для расчета относительной площади пика.

Фиг. 3 - кривые тепловой денатурации по данным дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) конструкции scFv. Показаны данные двух измерений. Полученное значение  $T_{пл}$  было определено путем подбора значений уравнения Больцмана для получения средней точки перехода.

Фиг. 4 - зависимость содержания мономера конструкции scFv от времени при хранении. Представлен график содержания мономера, определенного методом эксклюзионной ВЭЖХ, для температур хранения 4, -20 и <-65°C в течение 4 недель.

Фиг. 5 - наложение хроматограмм эксклюзионной ВЭЖХ для молекулы scFv. Представлен образец (10 мг/мл) в начальный момент времени и после хранения при 4°C в течение 4 недель. Помимо этого представлена хроматограмма образца после 5 циклов замораживания и оттаивания. На вставленной панели показано примерно 15-кратное увеличение оси y для каждой молекулы для визуализации в том числе минимальных изменений в содержании олигомеров.

Фиг. 6 - зависимость содержания мономера гуманизованного scFv от времени при хранении. Представлен график содержания мономера, определенного методом эксклюзионной ВЭЖХ, для образцов с концентрацией 10 мг/мл при температуре хранения 37°C в течение 4 недель.

Фиг. 7 - способность scFv нейтрализовать ФНО $\alpha$  человека в анализе с L929. Представлены кривые зависимости "доза-ответ" для scFv и эталонного антитела, представляющего собой инфликсимаб. Максимальные концентрации scFv и инфликсимаба и отрицательные контроли принимали за 100 и 0% роста.

Фиг. 8 - способность scFv нейтрализовать ФНО $\alpha$  приматов, не являющихся человеком, и ФНО $\alpha$  человека в анализе с L929. Представлены кривые зависимости "доза-ответ" для нейтрализации ФНО $\alpha$  человека, яванского макака и макака-резуса. Максимальную концентрацию scFv и отрицательные контроли принимали за 100% и 0% роста.

Фиг. 9 - способность scFv блокировать взаимодействие ФНО $\alpha$ -TNFR1. Представлены кривые зависимости "доза-ответ". Максимальную концентрацию scFv и отрицательные контроли принимали за 0% и 100% связывания ФНО $\alpha$  с TNFR1.

Фиг. 10 - способность scFv блокировать взаимодействие ФНО $\alpha$ -TNFR2. Представлены кривые зависимости "доза-ответ". Максимальную концентрацию scFv и отрицательные контроли принимали за 0% и 100% связывания ФНО $\alpha$  с TNFR2.

Фиг. 11 - специфичность scFv к мишени. Способность подавлять взаимодействие биотинилированного ФНО $\alpha$  с scFv с применением ФНО $\alpha$  и ФНО $\beta$  анализировали методом конкурентного ИФА. Представлены дозозависимые эффекты ФНО $\alpha$  и ФНО $\beta$ .

На фиг. 12 изображено образование комплексов 16-02-B03-scFv:ФНО $\alpha$ , определенное методом эксклюзионной ВЭЖХ (пример 4).

#### **Подробное описание изобретения**

Данное изобретение относится к антителу или его функциональному фрагменту, способному связываться с ФНО $\alpha$  человека.

В контексте данной заявки термин "антитело" использован как синоним для термина "иммуноглобулин" (Ig), который определен как белок, принадлежащий к классу IgG, IgM, IgE, IgA или IgD (или любому их подклассу), и включает все традиционно известные антитела и их функциональные фрагменты. В контексте данного изобретения "функциональный фрагмент" антитела/иммуноглобулина определен как антигенсвязывающий фрагмент или другое производное исходного антитела, которое по существу сохраняет одно или более свойств такого исходного антитела, упомянутых выше в пп. (1)-(30) данного описания. "Антигенсвязывающий фрагмент" антитела/иммуноглобулина определен как фрагмент (например, вариабельный участок IgG), который сохраняет антигенсвязывающий участок. "Антигенсвязы-

вающий участок" антитела, как правило, находится в одном или более гипервариабельном участке (участках) антитела, то есть участках CDR-1, -2 и/или -3. "Антигенсвязывающие фрагменты" согласно данному изобретению включают домен F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента и Fab-фрагмент. "Функциональные фрагменты" согласно данному изобретению включают scFv, dsFv, диатела, триотела, тетратела и Fc-гибридные белки. F(ab')<sub>2</sub> или Fab может быть сконструирован таким образом, чтобы минимизировать или полностью удалить межмолекулярные дисульфидные взаимодействия, происходящие между доменами CH1 и CL. Антитела или функциональные фрагменты согласно данному изобретению могут представлять собой часть би- или многофункциональных конструкций.

Предпочтительными функциональными фрагментами в данном изобретении являются scFv и диатела.

scFv представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент, в котором вариабельный домен легкой цепи ("V<sub>L</sub>") и вариабельный домен тяжелой цепи ("V<sub>H</sub>") соединены пептидным мостиком.

Диатело представляет собой димер, состоящий из двух фрагментов, каждый из которых имеет вариабельные участки, соединенные линкером или тому подобным (далее называемые образующими диатело фрагментами), и, как правило, содержит два V<sub>LS</sub> и два V<sub>HS</sub>. Образующие диатело фрагменты включают фрагменты, состоящие из V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> и V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub> и V<sub>H</sub> и т. д., предпочтительно V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>. В образующих диатело фрагментах линкер, соединяющий вариабельные участки, не имеет конкретных ограничений, но предпочтительно является достаточно коротким, чтобы избежать образования нековалентных связей между вариабельными участками одного фрагмента. Длина такого линкера может быть определена специалистами в данной области техники в зависимости от ситуации, но, как правило, составляет 2-14 аминокислот, предпочтительно 3-9 аминокислот, в частности 4-6 аминокислот. В этом случае V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub>, кодируемые в одном и том же фрагменте, соединены достаточно коротким линкером, чтобы избежать образования нековалентных связей между V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> в одной цепи и чтобы избежать образования одноцепочечных фрагментов вариабельного участка для того чтобы могли быть получены димеры с другим фрагментом. Димеры могут быть образованы с помощью ковалентных связей, нековалентных связей или и тех, и других между образующими диатело фрагментами.

Более того, образующие диатело фрагменты могут быть соединены линкером или тому подобным с получением одноцепочечных диател (sc(Fv)<sub>2</sub>). При соединении образующих диатело фрагментов длинным линкером, состоящим из примерно 15-20 аминокислот, могут быть образованы нековалентные связи между образующими диатело фрагментами, расположенными в одной цепи, с получением димеров. Основываясь на том же принципе, что и при получении диател, полимеризованные антитела, такие как тримеры или тетрамеры, также могут быть получены путем соединения трех или более образующих диатело фрагментов.

Предпочтительно антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению специфически связывается с ФНОα. В контексте данного описания антитело или его функциональный фрагмент "специфически распознает" или "специфически связывается с" ФНОα человека, когда антитело или функциональный фрагмент способно/способно различать ФНОα человека и одну или более молекул сравнения. Предпочтительно значение IC<sub>50</sub> для связывания с каждой молекулой сравнения по меньшей мере в 1000 раз превышает значение IC<sub>50</sub> для связывания с ФНОα, в частности как описано в примере 2, раздел 2.1.4. В наиболее общей форме (и когда не упоминается определенная ссылка), "специфическое связывание" относится к способности антитела или функционального фрагмента различать ФНОα человека и неродственные биомолекулы, при определении, например, в соответствии с конкретными методами анализа, известными в данной области техники. Такие методы включают, но не ограничиваются ими, методы вестерн-блоттинга и ИФА. Например, может быть выполнен стандартный анализ ИФА. Как правило, определение специфичности связывания проводят с использованием не одной молекулы сравнения, а группы из примерно трех-пяти неродственных биомолекул, таких как сухое молоко, БСА, трансферрин или тому подобное. В одном из вариантов реализации специфическое связывание относится к способности антитела или фрагмента различать ФНОα человека и ФНОβ человека.

Антитело согласно данному изобретению или функциональный фрагмент согласно данному изобретению содержит домен V<sub>L</sub> и домен V<sub>H</sub>. Домен V<sub>L</sub> содержит участок CDR1 (CDRL1), участок CDR2 (CDRL2), участок CDR3 (CDRL3) и каркасные участки. Домен V<sub>H</sub> содержит участок CDR1 (CDRH1), участок CDR2 (CDRH2), участок CDR3 (CDRH3) и каркасные участки.

Термин "CDR" относится к одному из шести гипервариабельных участков в вариабельных доменах антитела, преимущественно участвующих в связывании антигена. Одно из наиболее часто используемых определений для шести CDR было предложено Кабатом (Kabat E. A. et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242). В контексте данного описания определение CDR согласно Кабату применимо только для CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного домена легкой цепи (CDR L1, CDR L2, CDR L3, или L1, L2, L3), а также для CDR2 и CDR3 вариабельного домена тяжелой цепи (CDR H2, CDR H3, или H2, H3). CDR1 вариабельного домена тяжелой цепи (CDR H1, или H1), однако, в контексте данного описания, определяется следующими остатками (нумерация Кабата): начинается с положения 26 и заканчивается до положения 36.

Участок CDR1 домена  $V_L$  состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

Участок CDR2 домена  $V_L$  состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

Участок CDR3 домена  $V_L$  состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3.

Участок CDR1 домена  $V_H$  состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4.

Участок CDR2 домена  $V_H$  состоит из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5. Предпочтительно участок CDR2 домена  $V_H$  состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9. Наиболее предпочтительно участок CDR2 домена  $V_H$  состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.

Участок CDR3 домена  $V_H$  состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6.

В конкретном варианте реализации антитело согласно данному изобретению или функциональный фрагмент согласно данному изобретению содержит (i) домен  $V_L$ , содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и (ii) домен  $V_H$ , содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

В конкретном варианте реализации антитело согласно данному изобретению или функциональный фрагмент согласно данному изобретению содержит (i) домен  $V_L$ , содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и (ii) домен  $V_H$ , содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

В более предпочтительном варианте реализации антитело согласно данному изобретению или функциональный фрагмент согласно данному изобретению содержит домен  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 17. В еще более предпочтительном варианте реализации антитело или функциональный фрагмент содержит домен  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

В другом более предпочтительном варианте реализации антитело или функциональный фрагмент содержит домен  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 16. В еще более предпочтительном варианте реализации антитело или функциональный фрагмент содержит домен  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

В другом более предпочтительном варианте реализации антитело или функциональный фрагмент содержит (i) домен  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 17, и домен  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 16. Наиболее предпочтительно антитело согласно данному изобретению или функциональный фрагмент согласно данному изобретению содержит (i) домен  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и (ii) домен  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

В особенно предпочтительном варианте реализации антитело или функциональный фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело (scFv), содержащее домен  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 17, и домен  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 16. Наиболее предпочтительно функциональный фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело (scFv), содержащее домен  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и домен  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

Домен  $V_H$  и домен  $V_L$  предпочтительно соединены пептидным линкером. Пептидный линкер (далее называемый "линкер А"), как правило, имеет длину от примерно 10 до примерно 30 аминокислот, более предпочтительно от примерно 15 до примерно 25 аминокислот. Линкер А, как правило, содержит остатки глицина (Gly) и серина (Ser), но возможны и другие аминокислоты. В предпочтительных вариантах

реализации линкер содержит множественные повторы последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 20), например, от 2 до 6, или от 3 до 5, или 4 последовательных повторов аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20. Наиболее предпочтительно линкер А состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19. scFv может иметь следующую структуру (N-конец слева и С-конец справа):

$V_L$ -линкер А- $V_H$  или

$V_H$ -линкер А- $V_L$ .

Наиболее предпочтительно функциональный фрагмент представляет собой одноцепочечное анти-тело (scFv), состоящее из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 18.

В другом особенно предпочтительном варианте реализации функциональный фрагмент представляет собой диатело, содержащее домен  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 17, и домен  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 16. Наиболее предпочтительно функциональный фрагмент представляет собой диатело, содержащее домен  $V_H$ , имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и домен  $V_L$ , имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

Домен  $V_H$  и домен  $V_L$  соединены пептидным линкером. Пептидный линкер (далее называемый "линкер В") предпочтительно имеет длину от примерно 2 до примерно 10 аминокислот, более предпочтительно примерно 5 аминокислот. Линкер В, как правило, содержит остатки Gly и Ser, но возможны и другие аминокислоты. Наиболее предпочтительно линкер В состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20.

Диатело предпочтительно представляет собой моноспецифическое диатело, то есть направлено только на один эпитоп. Диатело предпочтительно представляет собой гомодимер. Диатело может представлять собой димер из двух полипептидных цепей, нековалентно связанных друг с другом. Каждый мономер может представлять собой полипептидную цепь, имеющую структуру:

$V_L$ -Линкер В- $V_H$  или

$V_H$ -Линкер В- $V_L$ .

Кроме того, образующие диатело фрагменты могут быть соединены линкером А или тому подобным с получением одноцепочечных диател ( $sc(Fv)_2$ ). При соединении образующих диатело фрагментов с использованием длинного линкера, содержащего примерно 15-20 аминокислот, могут образовываться нековалентные связи между образующими диатело фрагментами, находящимися в одной цепи, с получением димеров. Примеры структурной организации одноцепочечных диател включают следующие.

$V_H$  - линкер В -  $V_L$  - линкер А -  $V_H$ - линкер В -  $V_L$ .

$V_L$  - линкер В -  $V_H$  - линкер А -  $V_L$  - линкер В -  $V_H$ .

Предпочтительно диатело согласно данному изобретению имеет следующую структуру:

$V_L$  - линкер В -  $V_H$  - линкер А -  $V_L$  - линкер В -  $V_H$ .

Основываясь на том же принципе, что и при получении диател, полимеризованные антитела, такие как тримеры или тетрамеры, также могут быть получены путем соединения трех или более образующих диатело фрагментов.

В другом конкретном варианте реализации антитело согласно данному изобретению представляет собой иммуноглобулин, предпочтительно иммуноглобулин G (IgG). Подкласс IgG согласно данному изобретению не ограничен и включает IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>. Предпочтительно IgG согласно данному изобретению принадлежит к подклассу 1, то есть представляет собой молекулу IgG<sub>1</sub>.

### **Аффинность**

Антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению имеет высокую аффинность к ФНО $\alpha$  человека. Термин " $K_D$ " относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Как правило, антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению связывается с ФНО $\alpha$  человека с константой равновесия диссоциации ( $K_D$ ) менее примерно  $2 \times 10^{-10}$  М или даже ниже, при определении с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIACORE. В частности, определение  $K_D$  проводят, как описано в примере 2, раздел 2.1.1.

Перекрестная реактивность с ФНО $\alpha$  яванских макаков или макаков-резусов В конкретных вариантах реализации антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению имеет существенную аффинность к ФНО $\alpha$  животных, таких как яванские макаки (*Macaca fascicularis*) и/или макаки-резусы (*Macaca mulatta*). Это является преимуществом, поскольку доклинические тесты антител к ФНО $\alpha$  человека, такие как исследования токсичности, предпочтительно проводят с такими животными. Соответственно, антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению предпочтительно обладает перекрестной реактивностью с ФНО $\alpha$  животных, таких как яванские макаки и/или макаки-резусы. Определение аффинности проводят, как описано в примере 2, раздел 2.1.1.

В одном из вариантов реализации антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению

бретению обладает перекрестной реактивностью с ФНО $\alpha$  *Mасаса fascicularis*. Антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению предпочтительно обладает аффинностью к ФНО $\alpha$  *Mасаса fascicularis*, которая менее чем в 20 раз, в частности менее чем в 15 раз, еще более конкретно менее чем в 10 раз отличается от его аффинности к ФНО $\alpha$  человека. Как правило, антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению связывается с ФНО $\alpha$  *Mасаса fascicularis* с константой равновесия диссоциации ( $K_D$ ), где отношение  $R_{M.fascicularis}$  (i)  $K_D$  для связывания с ФНО $\alpha$  *Mасаса fascicularis* к (ii)  $K_D$  для связывания с ФНО $\alpha$  человека составляет менее 20.

$$R_{M.fascicularis} = \frac{K_D(M.fascicularis)}{K_D(\text{человека})}$$

$R_{M.fascicularis}$  предпочтительно составляет менее 15, в частности менее 10.

В другом варианте реализации антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению обладает перекрестной реактивностью с ФНО $\alpha$  *Mасаса mulatta*. Антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению предпочтительно обладает аффинностью к ФНО $\alpha$  *Mасаса mulatta*, которая менее чем в 20 раз, более конкретно менее чем в 15 раз, еще более конкретно менее чем в 12 раз отличается от его аффинности к ФНО $\alpha$  человека. Как правило, антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению связывается с ФНО $\alpha$  *Mасаса mulatta* с константой равновесия диссоциации ( $K_D$ ), где отношение  $R_{M.mulatta}$  (i)  $K_D$  для связывания с ФНО $\alpha$  *Mасаса mulatta* к (ii)  $K_D$  для связывания с ФНО $\alpha$  человека составляет менее 20.

$$R_{M.mulatta} = \frac{K_D(M.mulatta)}{K_D(\text{человека})}$$

$R_{M.mulatta}$  предпочтительно составляет менее 20, в частности менее 15, еще более конкретно менее 12.

В еще одном варианте реализации антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению обладает перекрестной реактивностью с ФНО $\alpha$  *Mасаса fascicularis* и ФНО $\alpha$  *Mасаса mulatta*. Антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению предпочтительно обладает аффинностью к ФНО $\alpha$  *Mасаса fascicularis*, которая менее чем в 20 раз, в частности менее чем в 15 раз, еще более конкретно менее чем в 10 раз отличается от его аффинности к ФНО $\alpha$  человека, и предпочтительно обладает аффинностью к ФНО $\alpha$  *Mасаса mulatta*, которая менее чем в 20 раз, более конкретно менее чем в 15 раз, еще более конкретно менее чем в 12 раз отличается от его аффинности к ФНО $\alpha$  человека. Отношение  $R_{M.fascicularis}$  антитела или функционального фрагмента предпочтительно составляет менее 20, в частности менее 15, еще более конкретно менее 10, а отношение  $R_{M.mulatta}$  антитела или функционального фрагмента предпочтительно составляет менее 20, в частности менее 15, еще более конкретно менее 12.

#### **Способность подавлять индуцированный ФНО $\alpha$ апоптоз клеток L929**

Антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению обладает высокой способностью подавлять индуцированный ФНО $\alpha$  апоптоз клеток L929. В конкретном варианте реализации антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению обладает более высокой по сравнению с известным антителом, представляющим собой инфликсимаб, способностью подавлять индуцированный ФНО $\alpha$  апоптоз клеток L929.

Способность относительно инфликсимаба может быть определена в анализе с L929, как описано в примере 2, раздел 2.1.2, данной заявки. Относительная способность антитела или функционального фрагмента согласно данному изобретению составляет более 1, предпочтительно более 1,2, более предпочтительно более 1,3, более предпочтительно более 1,5, где относительная активность представляет собой отношение (i) значения  $IC_{50}$  инфликсимаба в анализе с L929 к (ii) значению  $IC_{50}$  антитела или функционального фрагмента согласно данному изобретению в анализе с L929 и где  $IC_{50}$  означает концентрацию соответствующей молекулы в нг/мл, необходимую для достижения 50% максимального ингибирования индуцированного ФНО апоптоза клеток L929.

В другом варианте реализации относительная способность антитела или функционального фрагмента согласно данному изобретению составляет более 1, предпочтительно более 1,2, более предпочтительно более 1,3, более предпочтительно более 1,5, где относительная способность представляет собой отношение (i) значения  $IC_{90}$  инфликсимаба в анализе с L929 к (ii) значению  $IC_{90}$  антитела или функционального фрагмента согласно данному изобретению в анализе с L929 и где значение  $IC_{90}$  относится к концентрации соответствующей молекулы в нг/мл, необходимой для достижения 90% максимального ингибирования индуцированного ФНО апоптоза клеток L929.

#### **Подавление индуцированной ЛПС секреции цитокинов**

Антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению может обладать способностью подавлять индуцированную ЛПС секрецию цитокинов моноцитами. Индуцированная ЛПС секреция цитокинов моноцитами может быть определена, как описано в примере 7.

В одном из вариантов реализации антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению способно/способен подавлять индуцированную ЛПС секрецию интерлейкина-1 $\beta$  CD14<sup>+</sup> моноцитами. Значение  $IC_{50}$  для подавления индуцированной ЛПС секреции интерлейкина-1 $\beta$  может состав-

лать менее 1 нМ и/или менее 100 пг/мл. Значение  $IC_{50}$  для подавления индуцированной ЛПС секреции интерлейкина- $1\beta$ , рассчитанное в виде молярной или массо-объемной концентрации, может являться более низким, чем значение  $IC_{50}$  адалимумаба.

В другом варианте реализации антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению способно/способен подавлять индуцированную ЛПС секрецию ФНО $\alpha$  CD14<sup>+</sup> моноцитами. Значение  $IC_{50}$  для подавления индуцированной ЛПС секреции ФНО $\alpha$  может составлять менее 1 нМ и/или менее 150 пг/мл. Значение  $IC_{50}$  для подавления индуцированной ЛПС секреции ФНО $\alpha$ , рассчитанное в виде молярной или массо-объемной концентрации, может являться более низким, чем значение  $IC_{50}$  адалимумаба.

#### **Подавление клеточной пролиферации**

Антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению, может обладать способностью подавлять клеточную пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови в реакции смешанной культуры лимфоцитов. Подавление клеточной пролиферации может быть определено, как описано в примере 6. Индекс стимуляции антитела или функционального фрагмента, например, scFv или диатела согласно данному изобретению, определенный в соответствии с примером 6, может составлять менее 5 или менее 4,5. В конкретных вариантах реализации индекс стимуляции антитела, например, IgG согласно данному изобретению, составляет менее 4 или даже менее 3.

#### **Подавление взаимодействия ФНО $\alpha$ с рецептором ФНО**

Как правило, антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению способно/способен подавлять взаимодействие ФНО $\alpha$  человека с рецептором ФНО I (TNFRI). Подавление взаимодействия ФНО $\alpha$  человека с TNFRI может быть определено с помощью ингибиторного ИФА, как описано ниже в примере 2, раздел 2.1.3.

Способность антитела или функционального фрагмента согласно данному изобретению подавлять взаимодействие ФНО $\alpha$  человека с TNFRI относительно инфликсимаба (относительная способность) при определении с помощью ингибиторного ИФА предпочтительно составляет более 1, причем указанная относительная способность представляет собой отношение значения  $IC_{50}$  в нг/мл инфликсимаба к значению  $IC_{50}$  в нг/мл антитела или его функционального фрагмента.

Как правило, антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению способно/способен подавлять взаимодействие ФНО $\alpha$  человека с рецептором ФНО II (TNFRII). Подавление взаимодействия ФНО $\alpha$  человека с TNFRII может быть определено с помощью ингибиторного ИФА, как описано ниже в примере 2, раздел 2.1.3.

Способность антитела или функционального фрагмента согласно данному изобретению подавлять взаимодействие ФНО $\alpha$  человека с TNFRII относительно инфликсимаба (относительная способность) при определении с помощью ингибиторного ИФА предпочтительно составляет более единицы, более предпочтительно по меньшей мере 1,2, причем указанная относительная способность представляет собой отношение значения  $IC_{50}$  в нг/мл инфликсимаба к значению  $IC_{50}$  в нг/мл антитела или его функционального фрагмента.

#### **Стехиометрия и перекрестное связывание**

Антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению, как правило, способно/способен связываться с ФНО $\alpha_{\text{Тример}}$  человека в стехиометрическом отношении (антитело : ФНО $\alpha_{\text{Тример}}$ ), составляющем по меньшей мере 2. Стехиометрическое отношение (антитело : ФНО $\alpha_{\text{Тример}}$ ) предпочтительно составляет более 2, или по меньшей мере 2,5, или по меньшей мере 3. В одном из вариантов реализации стехиометрическое отношение (антитело : ФНО $\alpha_{\text{Тример}}$ ) составляет примерно 3. Стехиометрическое отношение (антитело : ФНО $\alpha_{\text{Тример}}$ ) может быть определено, как описано в примере 4 ниже.

В другом варианте реализации антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению способно/способен образовывать комплекс с ФНО $\alpha$  человека, причем указанный комплекс содержит по меньшей мере две молекулы ФНО $\alpha$  и по меньшей мере три молекулы антитела или функционального фрагмента. Функциональный фрагмент согласно этому варианту реализации содержит по меньшей мере два отдельных сайта связывания для ФНО $\alpha$ , таких как, например, диатела. Образование комплекса может быть определено, как описано в примере 5 ниже.

В одном из вариантов реализации антитело представляет собой IgG и способно образовывать с ФНО $\alpha$  комплекс молекулярной массой по меньшей мере 600 кДа. В другом варианте реализации функциональный фрагмент представляет собой диатело и способен образовывать с ФНО $\alpha$  комплекс молекулярной массой по меньшей мере 300 кДа.

#### **Селективность в отношении мишени**

В некоторых вариантах реализации антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению обладает высокой селективностью в отношении мишени, то есть может различать ФНО $\alpha$  и ФНО $\beta$ . Предпочтительно значение  $IC_{50}$  для ФНО $\beta$  по меньшей мере в 1000 раз превышает значение  $IC_{50}$  для ФНО $\alpha$  при определении с помощью конкурентного ИФА, как описано в примере 2, раздел 2.1.4. Бо-

лее предпочтительно значение  $IC_{50}$  для ФНО $\beta$  по меньшей мере в 5000 раз, наиболее предпочтительно по меньшей мере в 10000 превышает значение  $IC_{50}$  для ФНО $\alpha$  при определении с помощью конкурентного ИФА, как описано в примере 2, раздел 2.1.4.

#### **Выход продукта экспрессии и выход продукта рефолдинга**

В других вариантах реализации антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению, предпочтительно scFv или диатело, могут быть рекомбинантно экспрессированы с высокими выходами в микроорганизмах, таких как бактерии, или в других клетках. Предпочтительно выход продукта экспрессии в *E. coli*, определенный, как описано в примере 2, составляет по меньшей мере 0,2 г/л. В частности, это применимо к функциональным фрагментам, таким как scFv.

Выход продукта рефолдинга, определенный, как описано в примере 2, составляет по меньшей мере 10 мг/л, более предпочтительно по меньшей мере 20 мг/л, более предпочтительно по меньшей мере 40 мг/л, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 60 мг/л. В частности, это применимо к функциональным фрагментам, таким как scFv.

#### **Стабильность**

Как правило, антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению, предпочтительно scFv или диатело, обладает высокой стабильностью. Стабильность может быть оценена с помощью различных методик. "Температура плавления"  $T_{пл}$  варибельного домена антитела или функционального фрагмента согласно данному изобретению, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), как описано в примере 2, раздел 2.2.4, предпочтительно составляет по меньшей мере 65°C, более предпочтительно по меньшей мере 70°C, более предпочтительно по меньшей мере 75°C, наиболее предпочтительно по меньшей мере 80°C. "Температура плавления варибельного домена" в контексте данного описания относится к температуре плавления scFv, состоящего из последовательности  $V_L$  - Линкер А -  $V_H$ , где аминокислотная последовательность линкера А состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19. Например, температура плавления варибельного домена IgG определена как температура плавления соответствующего ему scFv, как определено выше.

Потеря содержания мономера (при концентрации 10 г/л; исходное содержание мономера >95%) после хранения в течение четырех недель при 4°C, определенная с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии, как описано в примере 2, раздел 2.2.5, предпочтительно составляет менее 5%, более предпочтительно менее 3%. Потеря содержания мономера (при концентрации 10 г/л; исходное содержание мономера >95%) после хранения в течение четырех недель при -20°C, определенная с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии, как описано в примере 2, раздел 2.2.5, предпочтительно составляет менее 5%, более предпочтительно менее 3%, более предпочтительно менее 1%, наиболее предпочтительно менее 0,5%. Потеря содержания мономера (при концентрации 10 г/л; исходное содержание мономера >95%) после хранения в течение четырех недель при -65°C, определенная с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии, как описано в примере 2, раздел 2.2.5, предпочтительно составляет менее 5%, более предпочтительно менее 3%, более предпочтительно менее 1%, наиболее предпочтительно менее 0,5%.

Потеря мономера после пяти последовательных циклов замораживания-оттаивания, определенная, как описано в примере 2, составляет менее 5%, более предпочтительно менее 1%, более предпочтительно менее 0,5%, наиболее предпочтительно менее 0,2%, например, 0,1% или 0,0%.

#### **Антитела и функциональные фрагменты**

Конкретные варианты реализации данного изобретения относятся к функциональным фрагментам антител, описанных в данном описании. Функциональные фрагменты включают, но не ограничиваются ими, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fab-фрагмент, scFv, диатела, триотела и тетратела. Предпочтительно функциональный фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело (scFv) или диатело. Более предпочтительно не являющиеся CDR последовательности scFv или диатела представляют собой последовательности человека.

Предпочтительно для минимизации потенциала иммуногенности у людей выбранный акцепторный каркас состоит из каркасных участков, полученных из консенсусных последовательностей человека или последовательностей зародышевой линии человека. В частности, каркасные участки I-III варибельного домена легкой цепи состоят из консенсусных последовательностей  $V_{k1}$  человека, соответствующих SEQ ID NOs: 21-23, и каркасного участка IV последовательности основанной на последовательности  $\lambda$  зародышевой линии, выбранной из SEQ ID NOs: 24-27. Поскольку остатки, которые не являются остатками консенсусной последовательности человека или последовательности зародышевой линии человека, могут вызывать иммунные реакции, количество таких остатков в каждом варибельном домене ( $V_H$  или  $V_L$ ) должно быть как можно более низким, предпочтительно менее 7, более предпочтительно менее 4, наиболее предпочтительно 0.

Предпочтительно антитело представляет собой моноклональное антитело. Термин "моноклональное антитело" в контексте данного описания не ограничен антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое получают из од-

ного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не к способу, которым его получают. Моноклональные антитела могут быть получены с применением широкого спектра методик, известных в данной области техники, включая применение гибридомной, рекомбинантной технологий и технологии фагового дисплея или их комбинации. (Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N. Y.).

В других вариантах реализации, включая варианты реализации, относящиеся к применению антител к ФНО $\alpha$  *in vivo* у людей, могут быть применены химерные, приматизированные, гуманизированные антитела или антитела человека. В предпочтительном варианте реализации антитело представляет собой антитело человека или гуманизированное антитело, более предпочтительно моноклональное антитело человека или моноклональное гуманизированное антитело.

Термин "химерное" антитело в контексте данного описания относится к антителу, содержащему вариабельные последовательности, полученные из иммуноглобулина, не являющегося иммуноглобулином человека, такого как антитело крысы или мыши, и константные участки иммуноглобулинов человека, как правило, выбранные из матрицы иммуноглобулина человека. Способы получения химерных антител известны в данной области техники. См., например, Morrison, 1985, Science 229(4719): 1202-7; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214-221; Gillies et al., 1985, J. Immunol. Methods 125: 191-202; патенты США №№ 5807715; 4816567 и 4816397, которые полностью включены в данное описание посредством ссылки.

Среднему специалисту в данной области техники доступны различные рекомбинантные методики для того чтобы сделать антитело, не являющееся антителом человека (например, антитело мыши), более подобным антителу человека путем получения иммуноглобулинов, цепей иммуноглобулинов или их фрагментов (таких как Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие связывающиеся с мишенью подпоследовательности антител), которые содержат минимальные последовательности, полученные из такого иммуноглобулина, не являющегося иммуноглобулином человека. В целом, полученное рекомбинантное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а, как правило, двух, вариабельных доменов, в которых все или по существу все участки CDR соответствуют участкам CDR иммуноглобулина, не являющегося иммуноглобулином человека, а все или по существу все участки FR представляют собой участки FR последовательности иммуноглобулина человека, в частности консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. CDR-привитые антитела представляют собой молекулы антител, имеющие один или более определяющих комплементарность участков (CDR) антитела, первоначально полученного от видов, не являющихся человеком, которые связываются с желаемым антигеном, и каркасные (FR) участки молекулы иммуноглобулина человека (EP239400; публикация PCT WO 91/09967; патенты США №№ 5225539; 5530101 и 5585089). Часто в процессе, называемом "гуманизацией", каркасные остатки в каркасных участках, полученных из иммуноглобулина человека, будут дополнительно замещены соответствующим остатком антитела - донора CDR для изменения, предпочтительно улучшения связывания антигена. Эти каркасные замены идентифицируют способами, хорошо известными в данной области техники, например, путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков для идентификации каркасных остатков, важных для связывания с антигеном, и сравнения последовательностей для идентификации необычных каркасных остатков в конкретных положениях. См., например, Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-7 и Queen et al., патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693761; 5693762 и 6180370 (каждый из указанных источников полностью включен посредством ссылки). Антитела могут быть сделаны более подобным антителу человека с применением множества дополнительных методик, известных в данной области техники, включая, например, рекомбинацию поверхностных остатков или изменение поверхности (EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol, 28:489-498; Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973, и перестановку цепей (патент США № 5565332), все указанные источники полностью включены в данное описание посредством ссылки. CDR-привитое или гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, константного участка выбранной матрицы иммуноглобулина человека.

В некоторых вариантах реализации гуманизированные антитела получают, как описано в источнике Queen et al., патентах США №№ 5530101; 5585089; 5693761; 5693762 и 6180370 (каждый из указанных источников полностью включен посредством ссылки).

В некоторых вариантах реализации антитела к ФНО $\alpha$  представляют собой антитела человека. Полностью "человеческие" антитела к ФНО $\alpha$  могут быть желательны для терапевтического лечения пациентов, являющихся людьми. В контексте данного описания "антитела человека" включают антитела, имеющие аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека, и включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или от животных, трансгенных по одному или более иммуноглобулинам человека и не экспрессирующих эндогенные иммуноглобулины. Антитела человека могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, включая методы фагового дисплея, описанные выше, с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей иммуноглобулинов человека. См. патенты США №№ 4444887 и 4716111 и публикации PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735 и WO 91/10741,

где каждый из указанных источников полностью включен в данное описание посредством ссылки. Антитела человека также могут быть получены с использованием трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но могут экспрессировать гены иммуноглобулинов человека. См., например, публикации PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; патенты США №№ 5413923; 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; 5885793; 5916771 и 5939598, которые полностью включены в данное описание посредством ссылки. Полностью человеческие антитела, которые распознают выбранный эпитоп, получены с использованием методики, называемой "управляемым отбором". В этом подходе выбранное моноклональное антитело, не являющееся антителом человека, например, антитело мыши, используют для управления отбором полностью человеческого антитела, распознающего тот же эпитоп (Jespers et al., 1988, *Biotechnology* 12:899-903).

В некоторых вариантах реализации антитела к ФНО $\alpha$  представляют собой приматизированные антитела. Термин "приматизированное антитело" относится к антителу, содержащему вариативные участки антитела обезьяны и константные участки антитела человека. Способы получения приватизированных антител известны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 5658570; 5681722 и 5693780, которые полностью включены в данное описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации антитела к ФНО $\alpha$  представляют собой дериватизированные антитела. Например, но не в качестве ограничения, дериватизированные антитела, которые были модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком (см. ниже описание конъюгатов антител) и т.д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена известными способами, включая, но не ограничиваясь ими, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Кроме того, производное может содержать одну или более неканонических аминокислот.

В других аспектах антитело к ФНО $\alpha$  содержит одну или более аминокислот, введенных в один или более из его гипервариативных участков, например, как описано в US 2007/0280931.

#### **Конъюгаты антител**

В некоторых вариантах реализации антитела к ФНО $\alpha$  представляют собой конъюгаты антител, которые модифицированы, например, путем ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу таким образом, что ковалентное присоединение не препятствует связыванию с ФНО $\alpha$ . Методики конъюгирования эффекторных фрагментов с антителами хорошо известны в данной области техники (см., например, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., at pp. 623-53 (Robinson et al., eds., 1987)); Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62: 119-58, и Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics* 83:67-123).

В одном из примеров антитело или его фрагмент подвергают слиянию посредством ковалентной связи (например, а пептидной связи), с N-конца или C-конца, с аминокислотной последовательностью другого белка (или его части; предпочтительно содержащей по меньшей мере 10, 20 или 50 аминокислот части белка). Предпочтительно антитело или его фрагмент связан с другим белком с N-конца константного домена антитела. Для осуществления такого слияния могут быть применены технологии рекомбинантной ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP0392745. В другом примере эффекторная молекула может увеличивать период полужизни *in vivo*. Примеры подходящих эффекторных молекул такого типа включают полимеры, альбумин, альбуминсвязывающие белки или связывающие альбумин соединения, такие как описанные в WO 2005/117984.

В некоторых вариантах реализации антитела к ФНО $\alpha$  могут быть присоединены к фрагментам поли(этиленгликоля) (ПЭГ). Например, если антитело представляет собой фрагмент антитела, фрагменты ПЭГ могут быть присоединены через любую доступную боковую цепь аминокислоты или функциональную группу концевой аминокислоты, расположенной во фрагменте антитела, например, любую свободную аминную, иминовую, тиольную, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут находиться во фрагменте антитела естественным образом или могут быть встроены во фрагмент методами генной инженерии с использованием методов рекомбинантной ДНК. См., например, патент США № 5219996. Для присоединения двух или более молекул ПЭГ могут быть использованы несколько сайтов. Предпочтительно фрагменты ПЭГ ковалентно связаны через тиольную группу по меньшей мере одного остатка цистеина, расположенного во фрагменте антитела. В случае, если в качестве места присоединения используют тиольную группу, могут быть использованы подходящим образом активированные эффекторные фрагменты, например, селективные в отношении тиолов производные, такие как малеимиды и производные цистеина.

В другом примере конъюгат антитела к ФНО $\alpha$  представляет собой модифицированный Fab'-фрагмент, который является пегилированным, то есть содержит ковалентно присоединенный к нему ПЭГ (поли(этиленгликоль)), например, в соответствии со способом, раскрытым в EP0948544. См. также *Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications*, (J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, New York, 1992); *Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications*, (J. Milton Harris and S.

Zalipsky, eds., American Chemical Society, Washington D. C, 1997); и Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, (M. Aslam and A. Dent, eds., Grove Publishers, New York, 1998), а также Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 54:531- 545.

#### **Фармацевтические композиции и лечение**

Лечение заболевания охватывает лечение пациентов, уже имеющих согласно диагнозу любую форму заболевания на любой клинической стадии или в любых проявлениях; задержку начала или развития или усугубления или ухудшения симптомов или признаков заболевания и/или предотвращение и/или снижение тяжести заболевания.

"Субъект" или "пациент", которому вводят антитело к ФНО $\alpha$  или его функциональный фрагмент, может представлять собой млекопитающее, такое как млекопитающее, не являющееся приматом (например, корова, свинья, лошадь, кошка, собака, крыса и т.д.), или примата (например, обезьяну или человека). В некоторых аспектах человек представляет собой пациента детского возраста. В некоторых аспектах человек представляет собой взрослого пациента.

Композиции, содержащие антитело к ФНО $\alpha$  и, необязательно, один или более дополнительных терапевтических агентов, таких как вторые терапевтические агенты, описанные ниже, описаны в данном описании. Указанные композиции, как правило, поставятся в качестве части стерильной фармацевтической композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель. Эта композиция может находиться в любой подходящей форме (в зависимости от желаемого способа ее введения пациенту).

Антитела к ФНО $\alpha$  и функциональные фрагменты могут быть введены пациенту различными путями, как то перорально, трансдермально, подкожно, интраназально, внутривенно, внутримышечно, интраокулярно, местно или локально. Наиболее подходящий путь введения в любом конкретном случае будет зависеть от конкретного антитела, субъекта, характера и тяжести заболевания и физического состояния субъекта. Как правило, антитело к ФНО $\alpha$  или его функциональный фрагмент вводят внутривенно.

В особенно предпочтительном варианте реализации антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению вводят перорально. Если введение осуществляют пероральным путем, функциональный фрагмент предпочтительно представляет собой одноцепочечное антитело (scFv), диатело или IgG.

В типичных вариантах реализации антитело к ФНО $\alpha$  или функциональный фрагмент присутствует в фармацевтической композиции в концентрации, достаточной для обеспечения внутривенного введения в количестве от 0,5 мг/кг массы тела до 20 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах реализации концентрация антитела или фрагмента, подходящая для применения в композициях и способах, описанных в данном описании, включает, но не ограничивается ими, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, 20 мг/кг или концентрацию в диапазоне между любыми из вышеуказанных значений, например от 1 до 10 мг/кг, от 5 до 15 мг/кг или от 10 до 18 мг/кг.

Эффективная доза антитела к ФНО $\alpha$  или функционального фрагмента может составлять от примерно 0,001 до примерно 750 мг/кг на одно (например, болюсное) введение, множество введений или непрерывное введение, или количество, необходимое для достижения концентрации в сыворотке, составляющей 0,01-5000 мкг/мл за одно (например, болюсное) введение, множество введений или непрерывное введение, или

любой эффективный диапазон или значение внутри него в зависимости от состояния, подлежащего лечению, пути введения и возраста, массы и состояния субъекта. В некоторых вариантах реализации каждая доза может находиться в диапазоне от примерно 0,5 мг до примерно 50 мг на килограмм массы тела или от примерно 3 мг до примерно 30 мг на килограмм массы тела. Антитело может быть приготовлено в виде водного раствора.

Фармацевтические композиции в целях удобства могут быть представлены в единичных дозированных формах, содержащих заранее определенное количество антитела к ФНО $\alpha$  или функционального фрагмента на дозу. Такая единица может содержать, например, от 0,5 мг до 5 г, например, но без ограничения, 1 мг, 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 750 мг, 1000 мг или любой диапазон между любыми двумя из вышеперечисленных значений, например, от 10 до 1000 мг, от 20 до 50 мг или от 30 до 300 мг. Фармацевтически приемлемые носители могут принимать самые различные формы в зависимости, например, от состояния, подлежащего лечению, или пути введения.

Определение эффективной дозы, общего количества доз и длительности лечения с применением антитела к ФНО $\alpha$  или его функционального фрагмента находится в пределах возможностей специалистов в данной области техники и может быть выполнено с помощью стандартного исследования с повышением дозы.

Терапевтические составы антител к ФНО $\alpha$  и функциональных фрагментов подходящие для способов, описанных в данном описании, могут быть приготовлены для хранения в виде лиофилизированных составов или водных растворов путем смешивания антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами, обычно используемыми в данной области техники (все из которых упоминаются в данном

описании как "носители"), то есть буферными агентами, стабилизирующими агентами, консервантами, изотонизирующими веществами, неионными детергентами, антиоксидантами и другими различными добавками. См. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980). Такие добавки должны быть нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях.

Буферные агенты обеспечивают поддержание pH в диапазоне, приближенном к физиологическим условиям. Они могут присутствовать в концентрации от примерно 2 мМ до примерно 50 мМ. Подходящие буферные агенты включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли, такие как цитратные буферы (например, смесь однозамещенного цитрата натрия и двузамещенного цитрата натрия, смесь лимонной кислоты и трехзамещенного цитрата натрия, смесь лимонной кислоты и однозамещенного цитрата натрия и т.д.), сукцинатные буферы (например, смесь янтарной кислоты и однозамещенного сукцината натрия, смесь янтарной кислоты и гидроксида натрия, смесь янтарной кислоты и двузамещенного сукцината натрия т.д.), тартратные буферы (например, смесь винной кислоты и тартрата натрия, смесь винной кислоты и тартрата калия, смесь винной кислоты и гидроксида натрия и т.д.), фумаратные буферы (например, смесь фумаровой кислоты и однозамещенного фумарата натрия, смесь фумаровой кислоты и двузамещенного фумарата натрия, смесь однозамещенного фумарата натрия и двузамещенного фумарата натрия и т.д.), глюконатные буферы (например, смесь глюконовой кислоты и глюконата натрия, смесь глюконовой кислоты и гидроксида натрия, смесь глюконовой кислоты и глюконата калия и т.д.), оксалатный буфер (например, смесь щавелевой кислоты и оксалата натрия, смесь щавелевой кислоты и гидроксида натрия, смесь щавелевой кислоты и оксалата калия и т.д.), лактатные буферы (например, смесь молочной кислоты и лактата натрия, смесь молочной кислоты и гидроксида натрия, смесь молочной кислоты и лактата калия и т.д.) и ацетатные буферы (например, смесь уксусной кислоты и ацетата натрия, смесь уксусной кислоты и гидроксида натрия и т.д.). Дополнительно могут быть использованы фосфатные буферы, гистидиновые буферы и соли триметиламина, такие как Трис.

Консерванты могут быть добавлены для замедления роста микроорганизмов и могут быть добавлены в количествах от 0,2% до 1% (мас./об.). Подходящие консерванты включают фенол, бензиловый спирт, метакрезол, метилпарабен, пропилпарабен, октадецилдиметилбензиламмония хлорид, галогениды бензалкония (например, хлорид, бромид и иодид), гексаметония хлорид и алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехин, резорцин, циклогексанол и 3-пентанол. Изотонизирующие вещества, иногда называемые "стабилизаторами", могут быть добавлены для обеспечения изотоничности жидких композиций и включают многоатомные сахарные спирты, предпочтительно трех- или более атомные или сахарные спирты, такие как глицерин, эритритол, арабитол, ксилитол, сорбитол и маннитол. Стабилизаторы относятся к широкой категории вспомогательных веществ, которые могут выполнять различные функции от наполнителя до добавки, которая солюбилизирует терапевтический агент или обеспечивает предотвращение денатурации или прилипания к стенке контейнера. Типичные стабилизаторы могут представлять собой многоатомные сахарные спирты (перечисленные выше); аминокислоты, такие как аргинин, лизин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аланин, орнитин, L-лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т.д., органические сахара или сахарные спирты, такие как лактоза, трегалоза, стахиоза, маннитол, сорбитол, ксилитол, рибитол, миоинозитол, галактитол, глицерин и тому подобное, включая циклические многоатомные спирты, такие как инозитол; полиэтиленгликоль; полимеры аминокислот; серосодержащие восстановители, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин,  $\alpha$ -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные полипептиды (например, пептиды, состоящие из 10 остатков или менее); белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, моносахариды, такие как ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза; дисахариды, такие как лактоза, мальтоза, сахароза, и трисахариды, такие как раффиноза; и полисахариды, такие как декстран. Стабилизаторы могут присутствовать в диапазоне от 0,1 до 10000 массовых частей на массовую часть активного белка.

Неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как "смачивающие агенты") могут быть добавлены для облегчения солюбилизации терапевтического агента, а также для защиты терапевтического белка от вызванной взбалтыванием агрегации, что также позволяет составу подвергаться напряжению сдвига поверхности без денатурации белка. Подходящие неионные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты (20, 80 и т.д.), полиоксамеры (184, 188 и т.д.), плурониловые полиолы, моноэфиры полиоксиэтиленсорбитана (TWEEN®-20, TWEEN®-80 и т.д.). Неионные поверхностно-активные вещества могут присутствовать в диапазоне от примерно 0,05 мг/мл до примерно 1,0 мг/мл или в диапазоне от примерно 0,07 мг/мл до примерно 0,2 мг/мл.

Дополнительные различные вспомогательные вещества включают агенты-наполнители (например, крахмал), хелатирующие агенты (например, ЭДТА), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метионин, витамин Е), ингибиторы протеаз и сорастворители.

Состав согласно данному описанию также может содержать второй терапевтический агент в дополнение к антителу к ФНО $\alpha$  или его функциональному фрагменту. Примеры подходящих вторых терапевтических агентов приведены ниже.

График введения может варьировать от одного раза в месяц до ежедневного введения в зависимости от ряда клинических факторов, включая тип заболевания, тяжесть заболевания и чувствительность пациента к антителу к ФНО $\alpha$  или функциональному фрагменту. В конкретных вариантах реализации, антитело к ФНО $\alpha$  или его функциональный фрагмент вводят ежедневно, два раза в неделю, три раза в неделю, через день, каждые 5 дней, каждые 10 дней, каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели или один раз месяц или в любом диапазоне между любыми двумя из вышеперечисленных значений, например, от одного раза в четыре дня до одного раза в месяц, от одного раза в 10 дней до одного раза в две недели или от двух до трех раз в неделю и т.д.

Доза антитела к ФНО $\alpha$  или функционального фрагмента, подлежащая введению, будет варьировать в зависимости от конкретного антитела, субъекта и характера и тяжести заболевания, физического состояния субъекта, схемы лечения (например, будет ли применен второй терапевтический агент) и выбранного пути введения; подходящая доза может быть легко определена специалистом в данной области техники.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что оптимальное количество и промежуток времени между отдельными введениями антитела к ФНО $\alpha$  или его функционального фрагмента будут определяться характером и степенью состояния, подлежащего лечению, формой, путем и местом введения, а также возрастом и состоянием конкретного субъекта, подлежащего лечению, и что в конечном итоге подходящие для применения дозы будут определены врачом. Введение может повторяться так часто, как это необходимо. При развитии побочных явлений количество и/или частота введений могут быть изменены или уменьшены в соответствии с обычной клинической практикой.

#### **Заболевания, подлежащие лечению**

Данное изобретение относится к способу лечения или предотвращения связанного с ФНО $\alpha$  человека заболевания у субъекта, включающему введение субъекту антитела или функционального фрагмента, как определено в данном описании. Термин "связанное с ФНО расстройство" или "связанное с ФНО заболевание" относится к любому расстройству, началу, прогрессированию или сохранению симптомов или патологическим состояниям, для которых требуется участие ФНО $\alpha$ . Иллюстративные связанные с ФНО расстройства включают, но не ограничиваются ими, хронические и/или аутоиммунные воспалительные состояния в целом, иммуноопосредованные воспалительные расстройства в целом, воспалительное заболевание ЦНС, воспалительные заболевания, поражающие глаз, сустав, кожу, слизистые оболочки, центральную нервную систему, желудочно-кишечный тракт, мочевыводящие пути или легкое, состояния увеита в целом, ретинит, HLA-B27+ увеит, болезнь Бехчета (Behçet), синдром сухого глаза, глаукому, синдром Шегрена (Sjögren), сахарный диабет (включая диабетическую нейропатию), резистентность к инсулину, состояния артрита в целом, ревматоидный артрит, остеоартрит, реактивный артрит и синдром Рейтера (Reiter), ювенильный артрит, анкилозирующий спондилоартрит, рассеянный склероз, синдром Гийена-Барре (Guillain-Barré), миастению гравис, боковой амиотрофический склероз, саркоидоз, гломерулонефрит, хроническую болезнь почек, цистит, псориаз (включая псориагический артрит), гнойный гидраденит, панникулит, гангренозную пиодермию, синдром SAPHO (синовит, акне, пустулез, гиперостоз и остит), акне, синдром Свита (Sweet), пузырьчатку, болезнь Крона (включая внекишечные проявления), язвенный колит, бронхиальную астму, гиперчувствительный пневмонит, общие аллергические реакции, аллергический ринит, аллергический синусит, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), фиброз легкого, гранулематоз Вегенера (Wegener), синдром Кавасаки (Kawasaki), гигантоклеточный артериит, васкулит Черджа-Стросса (Churg-Strauss), узелковый полиартериит, ожоги, болезнь "трансплантат против хозяина", реакции "трансплантат против хозяина", эпизоды отторжения после трансплантации органов или костного мозга, системные и локальные состояния васкулита в целом, системную и кожную красную волчанку, полимиозит и дерматомиозит, склеродермию, преэклампсию, острый и хронический панкреатит, вирусный гепатит, алкогольный гепатит, послеоперационное воспаление, такое как после офтальмологической операции (например, операции при катаракте (замена хрусталика) или глаукоме), операции на суставе (включая артроскопическую операцию), операции на связанных с суставом структурах (например, связках), челюстно-лицевой и/или стоматологической операции, минимально инвазивных сердечно-сосудистых вмешательств (например, ЧТКА, атерэктомии, установки стента), лапароскопических и/или эндоскопических интраабдоминальных и гинекологических вмешательств, эндоскопических урологических вмешательств (например, операции на предстательной железе, уретроскопии, цистоскопии, интерстициального цистита), или периоперационное воспаление (предотвращение) в целом, буллезный дерматит, нейтрофильный дерматит, токсический эпидермальный некролиз, пустулезный дерматит, церебральную малярию, гемолитический уремический синдром, отторжение аллотрансплантата, отит среднего уха, укусы змей, узловатую эритему, миелодиспластические синдромы, первичный склерозирующий холангит, серонегативную спондилоартропатию, аутоиммунную гемолитическую анемию, гранулематоз в ротолицевой области, вегетирующий гнойный стоматит, афтозный стоматит, десквамативный глоссит (geographic tongue), мигрирующий стоматит, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, паралич Белла, болезнь Крейтцфельда-Якоба (Creutzfeld-Jakob) и нейродегенеративные состояния в целом.

Связанный с раком остеолит, связанное с раком воспаление, связанная с раком боль, связанная с раком кахексия, метастазы в костях, острые и хронические формы боли, независимо от того, вызваны ли они центральными или периферическими эффектами ФНО $\alpha$  и классифицированы ли они как воспалительные, ноцицептивные или нейропатические формы боли, ишиаз, боль в пояснице, туннельный запястный синдром, комплексный регионарный болевой синдром (КРБС), подагра, постгерпетическая невралгия, фибромиалгия, местные болевые состояния, хронические болевые синдромы вследствие метастатической опухоли, дисменорея.

Конкретные расстройства, подлежащие лечению, включают состояния артрита в целом, ревматоидный артрит, остеоартрит, реактивный артрит, ювенильный артрит; псориаз, включая псориазический артрит; воспалительное заболевание кишечника, включая болезнь Крона, язвенный колит, включая проктит, сигмоидит, левосторонний колит, распространенный колит и панколит, неопределенный колит, микроскопический колит, включая коллагенозный и лимфоцитарный колит, колит при заболевании соединительной ткани, колит отключенной толстой кишки, колит при дивертикулярной болезни, эозинофильный колит и паучит.

Наиболее предпочтительно антитело или функциональный фрагмент согласно данному изобретению применяются для лечения воспалительного заболевания кишечника, в частности, болезни Крона, язвенного колита или микроскопического колита. Болезнь Крона может представлять собой болезнь Крона с поражением подвздошной кишки, толстого кишечника, подвздошной кишки и толстого кишечника или болезнь Крона с изолированным поражением верхних отделов (желудка, двенадцатиперстной кишки и/или тощей кишки), включая нестриктурирующий/непенетрирующий, стриктурирующий, пенетрирующий и включающий перианальные поражения характер течения заболевания, с возможностью любой комбинации локализации и характера течения заболевания из указанных выше. Язвенный колит может представлять собой язвенный проктит, проктосигмоидит, левосторонний колит, язвенный панколит и паучит.

#### **Комбинированная терапия и другие аспекты**

Предпочтительно пациент, получающий лечение с применением антитела к ФНО $\alpha$  или его функционального фрагмента, также получает другое обычно применяемое лекарственное средство. Например, пациент, страдающий воспалительным заболеванием кишечника, особенно имеющий заболевание от умеренного до тяжелого, как правило, также получает месалазин или его производные или пролекарства, кортикостероиды, например, будесонид или преднизолон (перорально или внутривенно (в/в)), иммунодепрессанты, например, азатиоприн/6-меркаптопурин (6-МР) или метотрексат, циклоспорин или такролимус. Другие лекарственные средства, которые могут быть совместно введены пациенту, включают биологические препараты, такие как инфликсимаб, адалимумаб, этанерцепт, цертолизумаба пэгол или другие. Дополнительные лекарственные средства, которые могут быть совместно введены пациенту, включают иммунодепрессанты (например, азатиоприн/6-МР или метотрексат или пероральный циклоспорин) для поддержания стабильной или более длительной ремиссии. Еще одним аспектом данного изобретения является применение антитела к ФНО $\alpha$  или функционального фрагмента, как определено выше в данном описании, для снижения воспаления.

Еще одним аспектом данного изобретения является антитело к ФНО $\alpha$  или функциональный фрагмент, как определено выше в данном описании, для применения для снижения воспаления у пациента, страдающего от воспалительного состояния.

Другим аспектом данного изобретения является способ лечения воспалительного состояния, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела к ФНО $\alpha$  или функционального фрагмента, как определено выше в данном описании. Указанное воспалительное состояние предпочтительно представляет собой одно из состояний, описанных выше.

Таблица 1. Сводные данные об аминокислотных последовательностях

SEQ ID NO:	Описание
1	CDR L1 клонов 16-02-B03, 16-04-F06 и 16-23-C06
2	CDR L2 клонов 16-02-B03, 16-04-F06 и 16-23-C06
3	CDR L3 клонов 16-02-B03, 16-04-F06 и 16-23-C06
4	CDR H1 клонов 16-02-B03, 16-04-F06 и 16-23-C06
5	Генетически детерминированный CDR H2
6	CDR H3 клонов 16-02-B03, 16-04-F06 и 16-23-C06
7	CDR H2 клона 16-02-B03
8	CDR H2 клона 16-04-F06
9	CDR H2 клона 16-23-C06
10	V <sub>L</sub> гуманизированного scFv клона 16-02-B03-sc02
11	V <sub>H</sub> гуманизированного scFv клона 16-02-B03-sc02
12	Гуманизированный scFv клона 16-02-B03-sc02
13	V <sub>L</sub> гуманизированного scFv клона 16-02-B03-sc05
14	V <sub>H</sub> гуманизированного scFv клона 16-02-B03-sc05
15	Гуманизированный scFv клона 16-02-B03-sc05
16	V <sub>L</sub> гуманизированного scFv клона 16-02-B03-sc06
17	V <sub>H</sub> гуманизированного scFv клона 16-02-B03-sc06
18	Гуманизированный scFv клона 16-02-B03-sc06
19	Линкерная последовательность в scFv
20	Линкерная последовательность в диателе
21	Консенсусная последовательность V <sub>K1</sub> каркасного участка I (положения 1-23 по Кабату)
22	Консенсусная последовательность V <sub>K1</sub> каркасного участка II (положения 35-49 по Кабату)
23	Консенсусная последовательность V <sub>K1</sub> каркасного участка III (положения 57-88 по Кабату)
24	последовательность основанная на последовательности V <sub>λ</sub> зародышевой линии каркасного участка IV (см. таблицу 11)
25	последовательность основанная на последовательности V <sub>λ</sub> зародышевой линии каркасного участка IV (см. таблицу 11)
26	последовательность основанная на последовательности V <sub>λ</sub> зародышевой линии каркасного участка IV (см. таблицу 11)
27	последовательность основанная на последовательности V <sub>λ</sub> зародышевой линии каркасного участка IV (см. таблицу 11)

### Примеры

Пример 1. Получение антител кролика, направленных на ФНО $\alpha$  человека.

1. Результаты.

1.1. Иммунизация.

Кроликов подвергали иммунизации очищенным рекомбинантным ФНО $\alpha$  человека (Peprotech, номер по каталогу 300-01A). В ходе иммунизации силу гуморального иммунного ответа на антиген качественно оценивали путем определения максимального разведения (титра) сыворотки каждого кролика, которое обеспечивало обнаруживаемое связывание поликлональных антител сыворотки с антигеном. Титры антител сыворотки к иммобилизованному рекомбинантному ФНО $\alpha$  человека оценивали с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА, см. 2.2.1). Для всех трех кроликов были показаны очень высокие титры,  $10 \times 10^6$ -кратное разведение сыворотки продолжало обеспечивать положительный сигнал (по меньшей мере в 3 раза более высокий, чем сигнал, полученный для сыворотки не получавшего антиген животного, которую использовали в качестве контроля фона) в ИФА. Помимо этого, способность различных сывороток кроликов подавлять биологическую активность ФНО $\alpha$  оценивали с помощью анализа на основе клеток L929 мыши (см. 2.2.3). Все три сыворотки подавляли индуцированный ФНО $\alpha$  апоптоз фибробластов мыши L929. Для кролика №3 была показана наиболее высокая нейтрализующая активность с 50% подавлением (IC<sub>50</sub>), достигаемым при разведении сыворотки 1:155000. По сравнению с кроликом №3, для кролика №2 и кролика №1 была показана примерно в 3 и 21 раз более низкая активность с достижением 50% подавления при разведении сыворотки 1:55500 и 1:7210 соответственно.

Лимфоциты, выделенные из селезенки всех трех животных, были выбраны для последующего выявления "хитов" (hit). Приоритет животных определяли на основании способности подавлять биологическую активность ФНО $\alpha$  в анализе с L929. Таким образом, наибольшее количество полученных "хитов" имело происхождение от кролика №3, а наименьшее количество "хитов" было получено от кролика №1.

1.2. Выявление "хитов" 1.2.1 Сортировка "хитов".

Была разработана методика сортировки на основе проточной цитометрии, обеспечивающая специфическое обнаружение и позволяющая выделить В-клетки, связывающие ФНО $\alpha$  с высокой аффинностью (см. 2.1), после чего проводили процедуру выявления "хитов".

Лимфоциты общим количеством  $33 \times 10^6$  (что соответствует 1,5% от общего количества выделенных лимфоцитов), полученные от всех трех кроликов, были охарактеризованы в двух независимых циклах сортировки. Из общего количества  $33 \times 10^6$  проанализированных клеток было выделено 3452 В-клетки,

экспрессирующие специфические антитела к ФНО $\alpha$ . Количество клонированных лимфоцитов были различными для трех кроликов, поскольку большее количество клеток выделяли от тех кроликов, сыворотка которых показала сильное подавление ФНО $\alpha$  в анализе с L929. Из числа выделенных В-клеток 792 клон были получены от кролика №1, 1144 клон - от кролика №2, и 1408 клонов - от кролика №3. Для 108 клонов происхождение от соответствующего кролика неизвестно, поскольку они получены из смеси остаточных лимфоцитов от всех 3 кроликов для обеспечения оптимального использования небольшого количества лимфоцитов из флаконов.

#### 1.2.2. Скрининг "хитов".

Результаты, полученные на стадии скрининга, основаны на исследованиях, проведенных с неочищенными антителами из супернатантов культуры клеток, секретирующих антитела (ASC), поскольку масштаб высокопроизводительного культивирования не позволяет очищать отдельные антитела кроликов. Такие супернатанты использовали для ранжирования большого количества антител друг относительно друга, но не для получения абсолютных значений (например, для подавления биологической активности ФНО $\alpha$ ), исключением являлась аффинность связывания. Супернатанты ASC подвергали скринингу в высокопроизводительном ИФА для анализа связывания с рекомбинантным ФНО $\alpha$  человека. Связывающиеся с ФНО $\alpha$ -супернатанты дополнительно характеризовали в отношении связывания с ФНО $\alpha$  яванского макака методом ИФА, кинетики связывания и их способности нейтрализовать биологическую активность ФНО $\alpha$  человека в анализе с L929. За исключением кинетики связывания, полученные при высокопроизводительном скрининге значения следует интерпретировать в качестве ответов "да" или "нет", которые основаны на точечных измерениях (без учета зависимости "доза-ответ"). Аффинность к ФНО $\alpha$  яванского макака и мыши анализировали для всех 102 клонов, которые были выбраны для амплификации и секвенирования переменных доменов тяжелой и легкой цепи антитела.

##### 1.2.2.1. Связывание с ФНО $\alpha$ человека.

Целью первичного скрининга является выявление клонов ASC, которые продуцируют антитела, специфичные к ФНО $\alpha$  человека. Для этой цели супернатанты культуры клеток 3452 клонов ASC анализировали на присутствие антител к ФНО $\alpha$  человека методом ИФА (см. 2.2.1). Используемый метод ИФА оценивает "количество" антител подтипа IgG, связанных с рекомбинантным ФНО $\alpha$  человека, однако не дает информации об аффинности или концентрации антител. В этом анализе супернатанты из 894 клонов ASC вызывали сигнал, который был явно выше фона. Доля "хитов" согласно скринингу была схожей для кролика №1 и кролика №2: 153 "хита" из 792 (19,3%), выявленных у кролика №1, и 225 "хитов" из 1144, выявленных у кролика №2 (19,7%). Для кролика №3 была продемонстрирована значительно большая доля "хитов" - 34,4%, что обуславливало выявление 484 "хитов" из 1408. Для всех 894 "хитов", выявленных в этом первичном скрининге, проводили определение кинетики связывания с помощью SPR (вторичный скрининг).

##### 1.2.2.2. Кинетика связывания с ФНО $\alpha$ .

Целью вторичного скрининга является получение количественной информации о качестве связывания с мишенью для каждого "хита", выявленного при первичном скрининге, методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR, см. 2.2.2). В отличие от ИФА, используемого при проведении первичного скрининга, этот метод оценивает кинетику связывания с мишенью в виде функции от времени. Это позволяет определить константы скорости для ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) антитела с мишенью. Отношение  $k_d/k_a$  позволяет рассчитать константу равновесия диссоциации (KD), которая отражает аффинность антитела в отношении мишени. Из 894 "хитов", выявленных при первичном скрининге, удалось определить аффинность связывания с ФНО $\alpha$  человека для 839 моноклональных антител кролика. Для остальных 55 антител аффинность не могла быть определена, поскольку концентрация антитела в супернатанте ASC была ниже предела обнаружения прибора для SPR при соответствующих настройках. 839 антитела к ФНО $\alpha$ , для которых можно было провести определение, продемонстрировали константы диссоциации (KD) в диапазоне от  $1,36 \times 10^{-13}$  М до  $1,14 \times 10^{-8}$  М. 69% всех проанализированных антител имели KD ниже 0,5 нМ.

Медианные значения KD, составляющие  $2,21 \times 10^{-10}$  М и  $2,09 \times 10^{-10}$  М, для "хитов", выявленных при скрининге от кроликов №2 и №3, были схожими, в то время как для кролика №1 были продемонстрированы примерно в 2 раза более высокие значения с медианным значением KD  $4,65 \times 10^{-10}$  М. При рассмотрении только нейтрализующих выявленных при скрининге "хитов" распределения аффинности были одинаковыми для всех трех животных, с более низкими значениями медианной KD (медианные значения KD от  $1,4 \times 10^{-10}$  М до  $1,27 \times 10^{-10}$  М). Аффинность менее 0,041 нМ, 0,029 нМ и 0,026 нМ была определена для 5% выявленных при скрининге "хитов" от кроликов №1, №2 и №3 соответственно. Для 2% супернатантов аффинность находилась даже в низком пиколярном диапазоне (менее 6,2 пМ, 7,9 пМ и 11 пМ). Высокий уровень выхода высокоаффинных антител, полученный в результате вторичного скрининга, обеспечивает широкую основу для выбора наиболее подходящих антител для гуманизации и изменения формата.

##### 1.2.2.3 Активность.

Для оценки активности был разработан анализ на основе клеток (анализ с L929) (см. 2.2.3). 506 из 894 выбранных антител (56,6%) подавляли индуцированный ФНО $\alpha$  апоптоз в анализе с L929 более чем на 50%. В соответствии с результатами, полученными при анализе титров, наибольшее процентное содержание нейтрализующих "хитов" было получено у кролика №3, где доля "хитов" составляла 62,8%, затем следует кролик №2 с долей "хитов" 56,4% и кролик №1 с наименьшей долей "хитов" 39,9%. Аффинность этих нейтрализующих антител находилась в диапазоне от  $1,36 \times 10^{-13}$  до  $1,19 \times 10^{-9}$  М.

#### 1.2.2.4. Видовая перекрестная реактивность (яванский макак).

Все 894 "хитов", выявленных при первичном скрининге, анализировали в отношении видовой перекрестной реактивности с ФНО $\alpha$  яванского макака с помощью ИФА (см. 2.2.1). Целью этого дополнительного скрининга являлось получение возможности отбора клонов ASC, для которых известно, что они обладают перекрестной реактивностью с ФНО $\alpha$  яванского макака. Используемый метод ИФА позволяет оценить "количество" антител подтипа IgG, связанных с рекомбинантным ФНО $\alpha$  яванского макака, однако не дает информации об аффинности или концентрации антител. Супернатанты от 414 (46%) клонов ASC вызывали явный сигнал (оптическая плотность (OD)  $\geq 1$ ). Процентное содержание "хитов", обладающих перекрестной реактивностью с ФНО $\alpha$  яванского макака, было близким для кролика №1 и кролика №3 и составляло 81 "хит" из 153 (52,9%), выявленный у кролика №1, и 236 "хитов" из 484, выявленных у кролика №3 (48,8%). Для кролика №2 было продемонстрировано несколько меньшее процентное содержание обладающих перекрестной реактивностью "хитов", составляющее 37,8%, что приводило к выявлению 82 "хитов" из 225.

#### 1.2.2.5 Выбор клонов для ОТ-ПЦР.

В качестве предварительного условия для подтверждения получения "хитов", анализа последовательности генов и последующей гуманизации антител кролика необходимо получить генетическую информацию, кодирующую варибельный домен антитела кролика. Это было осуществлено путем обратной транскрипции (ОТ) соответствующей информационной РНК с получением комплементарной ДНК (кДНК) с последующей амплификацией двухцепочечной ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выбор клонов ASC, подвергнутых ОТ-ПЦР, прежде всего был основан на аффинности и нейтрализующей активности. В качестве дополнительного критерия учитывали перекрестную реактивность с ФНО $\alpha$  яванского макака. Всего для клонирования генов с помощью ОТ-ПЦР было выбрано 102 клон ASC. Сначала было выбрано 93 наиболее перспективных ASC (с точки зрения аффинности) с KD менее 80 пМ, которые подавляли биологическую активность ФНО $\alpha$  в анализе с L929 более чем на 50% и демонстрировали значительное связывание с ФНО $\alpha$  яванского макака. Помимо этого, все 9 наиболее перспективных клонов ASC с KD менее 20 пМ, которые подавляли активность ФНО $\alpha$  более чем на 50%, но не связывались с ФНО $\alpha$  яванского макака, несмотря на это также были выбраны. Всего были успешно амплифицированы и секвенированы 12, 13 и 66 клонов ASC от кроликов №1, №2 и №3 соответственно.

1.2.2.6 Выявление родственных клонов с желаемыми свойствами Для того чтобы охарактеризовать генетическое разнообразие панели выделенных клонов ASC, последовательности определяющих комплементарность участков (CDR) подвергали экстракции и множественному выравниванию последовательностей, что обеспечивало возможность кластеризации последовательностей в филогенетическом древе.

В то время как этот анализ, с одной стороны, позволяет выбрать генетически разнообразный набор последовательностей клонов для последующих экспериментов по гуманизации и изменению формата, он также позволяет выявить гомологичные кластеры последовательностей клонов, которые, по-видимому, имеют общий исходный клон В-клеток у кролика. Отличительными признаками этих кластеров последовательностей являются высокая гомология последовательностей в CDR и единая закономерность фармакодинамических свойств. Оба этих свойства обобщены для кластера из восьми клонов в табл. 2 и 3. Несмотря на сохранение функций в этом кластере последовательностей, консенсусная последовательность в табл. 3 демонстрирует, что определенная варибельность CDR допустима при сохранении желаемого фармакодинамического профиля.

Таблица 2. Фармакодинамические свойства моноклональных антител в супернатантах В-клеток

С/н В-клеток ID клона	Аффинность к ФНО $\alpha$ человека			Аффинность к ФНО $\alpha$ яванского макака			Аффинность к ФНО $\alpha$ мыши			Нейтрализация ФНО $\alpha$ % подавления
	$k_a$ (M $^{-1}$ s $^{-1}$ )	$K_d$ (s $^{-1}$ )	$K_D$ (M)	$k_a$ (M $^{-1}$ s $^{-1}$ )	$K_d$ (s $^{-1}$ )	$K_D$ (M)	$k_a$ (M $^{-1}$ s $^{-1}$ )	$K_d$ (s $^{-1}$ )	$K_D$ (M)	
16-02-B03	1,19E+06	7,48E-06	6,27E-12	9,47E+05	1,54E-05	1,63E-11	4,62E+04	1,44E-04	3,12E-09	95,3
16-04-F06	1,43E+06	5,71E-05	4,01E-11	7,42E+05	8,28E-05	1,14E-10	3,98E+04	9,85E-04	2,48E-08	101,1
16-23-C06	1,20E+06	4,97E-05	4,14E-11	8,16E+05	1,02E-04	1,25E-10	3,72E+04	5,24E-04	1,41E-08	69,8

Таблица 3. Для указанных выше клонов были получены следующие данные о последовательностях, относящихся к CDR

CDR	Клон	Последовательность*	SEQ ID NO:
CDR L1	16-02-B03	QSSQSVYSSNLA	1
	16-04-F06	QSSQSVYSSNLA	1
	16-23-C06	QSSQSVYSSNLA	1
	Генетически детерминированный	QSSQSVYSSNLA	1
CDR L2	16-02-B03	SASKLAS	2
	16-04-F06	SASKLAS	2
	16-23-C06	SASKLAS	2
	Генетически детерминированный	SASKLAS	2
CDR L3	16-02-B03	QGTYYTSNWLNA	3
	16-04-F06	QGTYYTSNWLNA	3
	16-23-C06	QGTYYTSNWLNA	3
	Генетически детерминированный	QGTYYTSNWLNA	3
CDR H1	16-02-B03	GIDLSSYAMG	4
	16-04-F06	GIDLSSYAMG	4
	16-23-C06	GIDLSSYAMG	4
	Генетически детерминированный	GIDLSSYAMG	4
CDR H2	16-02-B03	TISVGGSTYYANWAEG	7
	16-04-F06	TISIGGSTYYANWAEG	8
	16-23-C06	TISIGGNTYYANWAEG	9
	Генетически детерминированный	TISXGGXTYYANWAEG	5
CDR H3	16-02-B03	GDYINFFYFNI	6
	16-04-F06	GDYINFFYFNI	6
	16-23-C06	GDYINFFYFNI	6
	Генетически детерминированный	GDYINFFYFNI	6

\*Аминокислоты, обозначенные как "X", имеют значение, определенное в прилагаемом перечне последовательностей.

#### 1.2.2.7. Перекрестная реактивность с ФНО $\alpha$ яванского макака и мыши (определенная методом SPR)

Вследствие большого количества "хитов" с высокой аффинностью, которые эффективно нейтрализуют ФНО $\alpha$ , видовую перекрестную реактивность оценивали для всех моноклональных антител кролика, которые подвергали ОТ-ПЦР, для облегчения выбора клонов ASC для подтверждения получения "хитов". Аффинность к ФНО $\alpha$  яванского макака и мыши определяли методом SPR аналогично описанному выше (см. также 2.2.2). Аффинность 93 исследованных антител к ФНО $\alpha$  яванского макака находилась в диапазоне от  $9,6 \times 10^{-12}$  до  $2,1 \times 10^{-9}$  М. 38 из 93 обладающих перекрестной реактивностью антител связывались с ФНО $\alpha$  человека и яванского макака с аналогичной аффинностью (KD отличались менее чем в два раза). Кроме того, аффинность к ФНО $\alpha$  человека и яванского макака отличалась менее чем в 20 раз для 79 из 93 обладающих перекрестной реактивностью антител и менее чем в 10 раз для 62 из них, что делает их приемлемыми для доклинических исследований с использованием яванских макаков. 2. Способы

#### 2.1. Сортировочный анализ.

Процедуру сортировки на основе проточной цитометрии для выделения антигенспецифичных В-клеток из лимфатической ткани кролика выполняли, как описано в источнике Lalor et al (Eur J Immunol. 1992;22.3001-2011).

#### 2.2. Скрининговое исследование.

##### 2.2.1. Определение связывания с ФНО $\alpha$ методом ИФА (ФНО $\alpha$ человека и яванского макака).

Рекомбинантный ФНО $\alpha$  человека (Reprotech, номер по каталогу 300-01) наносили на 96-луночный планшет для микротитрования для ИФА. Связывание антител кролика в супернатантах культуры ASC с иммобилизованным ФНО $\alpha$  обнаруживали с применением вторичного меченого HRP IgG к иммуноглобулинам кролика (Jackson ImmunoResearch, номер по каталогу. 111-035-046). Добавляли субстрат ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, KPL, номер по каталогу 53-00-00) и останавливали реакцию с развитием окрашивания путем добавления  $H_2SO_4$ . Планшеты считывали с использованием устройства для считывания планшетов для микротитрования (Infinity reader M200 Pro, Tecan) при длине волны 450 нм.

Эффективность анализа во время циклов скрининга контролировали с помощью коммерчески доступного поликлонального антитела кролика к ФНО $\alpha$  в качестве положительного контроля (AbD Serotec, номер по каталогу 9295-0174). Для этой цели являющееся положительным контролем антитело исследовали в концентрации 100 и 250 нг/мл в двух повторностях в каждом планшете для скрининга. Устойчивость и точность ответа положительного контроля контролировали для каждого планшета. При конечных условиях анализа отношение сигнал-фон составляло от 30 до 40 для положительного контроля в концентрации 250 нг/мл, а коэффициент вариации (КВ) положительного контроля составлял менее 10%. Сигнал с оптической плотностью  $\geq 100\%$  относительно положительного контроля в концентрации 250 нг/мл рассматривали как "хит" первичного скрининга.

Для определения титра сыворотки использовали те же условия ИФА, как описано выше. Разведение сыворотки считали положительным, когда сигнал связывания иммунной сыворотки был по меньшей ме-

ре в 3 раза более высоким по сравнению с сигналом сыворотки не получавшего антигена животного.

Видовую перекрестную реактивность с яванским макаком определяли с использованием аналогичного ИФА, как описано выше. Рекомбинантный ФНО $\alpha$  яванского макака (Sino Biological, номер по каталогу 90018-CNAE) наносили на 96-луночный планшет для микротитрования для ИФА. Связывание антител кролика в супернатантах культуры ASC с иммобилизованным ФНО $\alpha$  яванского макака обнаруживали с применением вторичного меченного HRP антитела, как указано выше. Иммуноную сыворотку от кролика №2 использовали в качестве положительного контроля при разведении 1:80000 и 1:320000. Устойчивость и точность ответа положительного контроля контролировали для каждого планшета. При конечных условиях анализа отношение сигнал-фон составляло от 20 до 30 для положительного контроля при разведении 1:80000, а КВ положительного контроля составляли менее 10%.

2.2.2. Кинетика связывания с ФНО $\alpha$  (человека, яванского макака и мыши), определенная методом SPR.

Аффинность связывания антител с ФНО $\alpha$  человека определяли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием прибора для SPR MASS-1 (Sierra Sensors). Производительность прибора определяли с помощью стандартных эталонных растворов, а также анализа взаимодействия эталонного антитела с антигеном, такого как взаимодействие инфликсимаба с ФНО $\alpha$ .

Для скрининга аффинности антител, специфичное к Fc-участку IgG кролика (Bethyl Laboratories, номер по каталогу A120-111A), иммобилизовали на сенсорном чипе (SPR-2 Affinity Sensor, High Capacity Amine, Sierra Sensors) с использованием стандартной методики конъюгации аминов. Моноклональные антитела кролика в супернатантах ASC захватывались иммобилизованным антителом к IgG кролика. После захвата моноклональных антител выполняли инъекцию ФНО $\alpha$  человека (Peprotech, номер по каталогу 300-01) в проточные ячейки в течение 3 мин в концентрации 90 нМ и оставляли на 5 мин для протекания диссоциации белка от IgG, захваченного на сенсорном чипе. После каждого цикла инъекций поверхность подвергали регенерации с помощью двух инъекций 10 мМ глицин-HCl. Кажущиеся константы скорости диссоциации ( $k_d$ ) и ассоциации ( $k_a$ ) и кажущуюся константу равновесия диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали с помощью программного обеспечения для анализа MASS-1 (Analyzer, Sierra Sensors) с применением модели связывания Лэнгмюра "один к одному", а качество аппроксимации контролировали на основании критерия  $\chi^2$  ( $\chi^2$ , нормированного на экстраполированный максимальный уровень связывания аналита), который является мерой качества подбора кривой. Для большинства "хитов" относительное значение  $\chi^2$  составляло менее 15%. Результаты признавали значимыми, если значения единиц ответа (RU) для связывания лиганда составляли по меньшей мере 2% от значений RU для захвата антитела. Образцы со значениями RU для связывания лиганда, составлявшими менее чем 2% от значений RU для захвата антитела, рассматривали как не демонстрирующие специфического связывания ФНО $\alpha$  с захваченным антителом.

Видовую перекрестную реактивность с ФНО $\alpha$  яванского макака (Sino Biological, номер по каталогу 90018-CNAE) и ФНО $\alpha$  мыши (Peprotech, номер по каталогу 315-01A) определяли с использованием тех же условий анализа и концентраций ФНО $\alpha$  и применением тех же мер качества. Относительный  $\chi^2$  составлял менее 15% для большинства проанализированных супернатантов ASC.

2.2.3. Индуцированный ФНО $\alpha$  апоптоз фибробластов L929.

Способность IgG кролика из супернатантов культуры ASC нейтрализовать биологическую активность рекомбинантного ФНО $\alpha$  человека оценивали с использованием фибробластов мыши L929 (ATCC/LGC Standards, номер по каталогу CCL-1). Клетки L929 сенсibilizировали к индуцированному ФНО $\alpha$  апоптозу путем добавления 1 мкг/мл актиномина D. Клетки культивировали в 96-луночных планшетах для микротитрования с плоским дном в присутствии 50% супернатанта культуры ASC и 100 пМ (5,2 нг/мл) ФНО $\alpha$  человека (Peprotech, номер по каталогу 300-01) в течение 24 ч. По сравнению с очищенными антителами, в присутствии супернатантов ASC необходимо было использовать более высокие концентрации ФНО $\alpha$  для скрининга "хитов". Выживаемость клеток определяли с помощью колориметрического анализа с применением реагента для детекции пролиферации клеток WST-8 (2-(2-метокси-4-нитрофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-(2,4-дисульфобензил)-2Н-тетразолий, моносодиевая соль) (Sigma Aldrich, номер по каталогу 96992). WST-8 восстанавливается под действием дегидрогеназ клетки с образованием оранжевого продукта формазана. Количество образующегося формазана прямо пропорционально количеству живых клеток. Данные анализировали с применением четырехпараметрической логистической модели для подбора кривой, используя программное обеспечение для анализа данных Softmax (Molecular Devices), и рассчитывали концентрацию инфликсимаба, необходимую для нейтрализации индуцированного ФНО $\alpha$  апоптоза 50% ( $IC_{50}$ ) при концентрации 36,2 нг/мл. Таким образом, рассчитанный нижний предел обнаружения для этого анализа составляет от 30 до 40 нг/мл. Это значение является лишь приблизительной оценкой предела обнаружения, поскольку способность блокировать ФНО $\alpha$  зависит не только от концентрации моноклонального антитела, но также от аффинности антитела к мишени. Однако чувствительность анализа достаточна для скрининга супернатантов, поскольку концентрации IgG в большинстве супернатантов ASC превышают концентрацию 40 нг/мл.

Супернатанты, приводящие к 50% нейтрализации индуцированного ФНО $\alpha$  апоптоза, считали положительными.

Для обеспечения устойчивой эффективности анализа при проведении циклов скрининга используемое в качестве положительного контроля антитело инфликсимаб анализировали в концентрациях 115 нг/мл (0,8 нМ) и 58 нг/мл (0,4 нМ) в двух повторностях в каждом планшете для скрининга. Процент подавления и точность ответа на положительный контроль контролировали для каждого используемого для скрининга планшета. Критерии приемлемости для каждого планшета устанавливали следующим образом: по меньшей мере 60% подавления используемого в качестве положительного контроля антитела в концентрации 115 нг/мл с коэффициентом вариации (КВ) менее 20%.

Пример 2. Гуманизация и получение scFv.

#### 1. Результаты.

##### 1.1. Подтверждение получения "хитов" и выбор "хитов" для гуманизации.

73 уникальных набора исходных переменных доменов легких и тяжелых цепей антител кролика были получены во время скрининга "хитов" и проанализированы путем выравнивания последовательностей. На основании результатов скринингового анализа и гомологии последовательностей отдельных клонов IgG кролика были выбраны 30 кандидатов для подтверждения получения "хитов". Было получено 29 моноклональных антител, и наиболее эффективные клоны с точки зрения аффинности и активности были выбраны для гуманизации и получения кандидата-лидера (lead candidate). Критериями выбора клонов являлись i) нейтрализация ФНО $\alpha$  человека в анализе с L929, ii) высокая аффинность к ФНО $\alpha$  человека, iii) перекрестная реактивность с ФНО $\alpha$  яванского макака и макака-резуса и iv) разнообразие последовательностей. Для гуманизации был выбран один клон (16-02-B03) как один из наиболее перспективных IgG с точки зрения способности к нейтрализации ФНО $\alpha$  человека в анализе с L929. В отношении силы связывания предпочтительна высокая аффинность, поскольку необходимо предвидеть некоторую потерю аффинности в результате гуманизации и изменения формата на формат scFv.

Данные для клона IgG № 16-02-B03 приведены в табл. 4.

Таблица 4. Характеристики связывания и активности *in vitro* очищенного моноклонального антитела 16-02-B03

Аффинность к ФНО $\alpha$ человека			Аффинность к ФНО $\alpha$ яванского макака			Аффинность к ФНО $\alpha$ макака-резуса			Актив-ность в анализе с L929	Блокирова-ние взаимод-ействия ФНО $\alpha$ с TNFR1	Блокирова-ние взаимод-ействия ФНО $\alpha$ с TNFR2
$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	KD (M)	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	KD (M)	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	KD (M)			
1,52E+06	7,59E-06	4,99E-12	9,12E+05	1,19E-04	1,31E-10	5,80E+05	2,44E-05	4,20E-11	отн. IC <sub>50</sub> *	отн. IC <sub>50</sub> *	отн. IC <sub>50</sub> *
									3,84	0,60	0,65

\*: IC<sub>50</sub>, инфликсимаб/IC<sub>50</sub>, исследуемый образец

##### 1.2. Получение и отбор гуманизированных фрагментов scFv.

Последовательности, кодирующие определяющие комплементарность участки (CDR), переносили *in silico* путем прививки петель CDR на каркасную последовательность переменного домена антитела человека, как описано в WO 2014/206561. Помимо этого, была получена вторая конструкция для каждого клона кролика, которая переносила дополнительные аминокислоты из донорной последовательности в положения, имеющие структурную значимость для позиционирования доменов иммуноглобулина и CDR. Был синтезирован (из соответствующих переменных легких и тяжелых цепей) искусственный ген (с оптимизированным использованием кодонов для бактериальной экспрессии), кодирующий соответствующее гуманизованное одноцепочечное антитело Fv (scFv). Затем был получен полипептид и впоследствии охарактеризован с использованием аналогичных исследований, как описано для процесса подтверждения получения "хитов".

##### 1.2.1 Гуманизация и получение гуманизированных scFv (активных фармакологических ингредиентов (API)).

Гуманизация выбранного клона включала перенос CDR антитела кролика на акцепторный каркас scFv типа Vk1/VH3, как описано в WO 2014/206561. В этом способе, который схематически представлен на фиг. 1, аминокислотная последовательность шести участков CDR была идентифицирована в донорной последовательности (мАТ кролика) и привита на каркасную последовательность акцептора с получением конструкции, названной "трансплантат CDR".

Помимо этого, был разработан второй трансплантат, который включал дополнительные модификации аминокислот донорного антитела кролика в положениях L15, L22, L48, L57, L74, L87, L88, L90, L92, L95, L97, L99 и H24, H25, H56, H82, H84, H89, H108 (нумерация АНо), которые, как было описано, потенциально влияют на позиционирование CDR и, следовательно, связывание антигена (Borras et al., 2010, JBC 285:9054-9066). Эта гуманизованная конструкция названа "структурный (STR) трансплантат". В случае, когда сравнение данных характеристик для этих двух исходных конструкций показало значительное преимущество конструкции STR, были разработаны дополнительные варианты, которые объединяли CDR-привитые VL с STR-привитыми VH. Было доказано, что эта комбинация часто является

достаточной для сохранения активности трансплантата STR (Borras et al. JBC. 2010;285:9054-9066) и в целом является более предпочтительной, поскольку меньшее количество изменений, не связанных с антителом человека, в акцепторном каркасе антитела человека снижают риск ухудшения стабильности, а также потенциал иммуногенности.

После завершения разработки конструкции *in silico*, описанной в предыдущем разделе, синтезировали соответствующие гены и конструировали векторы бактериальной экспрессии. Последовательность экспрессионных конструкций была подтверждена на уровне ДНК, и конструкции получали в соответствии с общими протоколами экспрессии и очистки.

Гетерологичную экспрессию белков проводили в *E.coli* в виде нерастворимых телец включения. Культуру экспрессии инокулировали экспоненциально растущей исходной культурой. Культивирование проводили во встряхиваемых колбах в орбитальном шейкере с использованием коммерчески доступных обогащенных сред. Клетки выращивали до установленной  $OD_{600}$ , равной 2, и индуцировали путем ночной экспрессии с добавлением 1 мМ изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозида (IPTG). По окончании культивирования клетки собирали центрифугированием и гомогенизировали с помощью обработки ультразвуком. На этой стадии уровень экспрессии различных конструкций определяли с помощью электрофореза лизата клеток в ПААГ с добавлением ДНС. Тельца включения выделяли из гомогенизированного остатка клеток с использованием протокола центрифугирования, который включал несколько стадий промывки для удаления остатков клеток и других примесей клеток-хозяев. Очищенные тельца включения солиubilizировали в денатурирующем буфере (100 мМ Трис/HCl, pH 8,0, 6 М гуанидин-HCl, 2 мМ ЭДТА) и подвергали scFv рефолдингу с помощью масштабируемого протокола рефолдинга, который обеспечивал получение миллиграммовых количеств мономерного scFv с нативной структурой. Для очистки scFv использовали стандартизованный протокол, который включал следующие стадии. Продукт после рефолдинга захватывали с помощью аффинной хроматографии с использованием агарозы Capto L (GE Healthcare) с получением очищенного scFv. Кандидаты-лидеры, которые соответствовали критериям аффинности и активности при начальной проверке, дополнительно очищали, подвергая заключительной эксклюзионной хроматографии с использованием колонки HiLoad Superdex75 (GE Healthcare). После выполнения протокола очистки белки были приготовлены в буферном солевом растворе и охарактеризованы с помощью различных биофизических методов, методов анализа белковых взаимодействий и биологических методов, как описано ниже. Производительность различных конструкций сравнивали путем определения конечного выхода очищенного белка на партию и нормализации этого значения на 1 л объема рефолдинга.

#### 1.2.2. Определение биофизических характеристик гуманизованного scFv.

Биофизические характеристики scFv в отношении стабильности и производительности представлены в табл. 5. Производительность и стабильность конструкции scFv была охарактеризована различными контрольными точками, как описано в последующих разделах.

scFv исследовали в соответствии с определенными критериями, как пояснено ниже.

Критерий производительности должен гарантировать, что выбранная структура scFv может быть экспрессирована, подвергнута рефолдингу и очищена в достаточных количествах для обеспечения дальнейшей разработки молекулы-лидера (lead molecule). Определенными критериями были выход продукта экспрессии scFv на литр культуральной жидкости при оценке методом электрофореза в ПААГ с добавлением ДНС и выход продукта очистки, достигаемый в общем лабораторном способе, при оценке путем определения количества очищенного белка с помощью УФ-спектрометрии в пересчете на 1 л раствора для рефолдинга.

Критерии стабильности были предназначены для оценки склонности к агрегации в процессе получения молекул и их структурной целостности при хранении и дальнейшей обработке. Содержание мономера, определенное с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, позволяет оценить стабильность коллоидного раствора молекул в процессе очистки (2.2.3). В последующем исследовании стабильности содержание мономера определяли в течение 4 недель при концентрации 1 и 10 мг/мл и хранении при 4, -20 и < -65°C. Помимо этого, стабильность коллоидного раствора белков определяли после 5 циклов замораживания и оттаивания. В качестве дополнительного показателя стабильности определяли среднюю точку тепловой денатурации методом дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) (2.2.4), получая данные по конформационной стабильности кандидатов-лидеров.

Таблица 5. Сводные данные биофизических характеристик гуманизованного scFv

	ID клона	Конструкция	Стабильность				Производительность			
			Тпл [°C]	Хранение [ $\Delta$ %]			Замораживание/оттаивание [ $\Delta$ %]	Чистота [%]	Экспрессия [г/л]	Выход очистки [мг/л]
				-65°C	-20°C	4°C				
16-02-B03-sc02	16-02-B03	CDR	86,4	0,0	0,0	2,3	0,0	97,0	0,29	65,0

#### 1.2.2.1. Оценка производительности.

Молекулы scFv, являющиеся кандидатами-лидерами, экспрессировали путем культивирования во

встрягиваемых колбах в периодическом режиме и очищали с помощью общего лабораторного способа с получением образцов белка для дальнейшего определения характеристик. В ходе этого процесса контролировали некоторые ключевые параметры производительности для сравнения молекул-кандидатов и выявления потенциально сложных для разработки конструкций.

Титр экспрессии определяли на уровне неочищенного лизата *E.coli* после сбора клеток центрифугированием. Во время сбора ожидается небольшая потеря клеток, однако этот фактор было решено не учитывать при расчете выхода продукта экспрессии, предпочитая более консервативную оценку производительности. Для количественного определения продукта scFv в лизате был выбран восстанавливающий электрофорез в ПААГ с добавлением ДНС с окрашиванием Кумасси (2.2.1) вследствие высокой специфичности этого метода, которая позволяет отличать продукт от белков клетки-хозяина в образце.

Вторым критерием оценки продуктивности является выход продукта очистки scFv в расчете на литр раствора для рефолдинга. Этот параметр указывает на потенциальный лимитирующий фактор в ожидаемом способе получения, который включает стадию рефолдинга белка. Поскольку доказано, что эффективность процедуры рефолдинга является лимитирующей в сопоставимых способах получения, было решено сравнивать производительность различных конструкций, принимая во внимание производительность, нормированную на определенный объем рефолдинга. Для расчета выхода образец конечного белка из каждой партии подвергали количественной оценке по поглощению УФ (2.2.2) и делили на фактический объем рефолдинга соответствующей очистки (табл. 6).

Титр экспрессии определяли с помощью количественного электрофореза лизатов клеток на конечном этапе производственного цикла в ПААГ с добавлением ДНС. Выход партии определяли с помощью измерения поглощения УФ пула после конечной очистки. Выход продукта очистки рассчитывали как количество очищенного scFv на литр объема рефолдинга (табл. 6).

Таблица 6. Сводные данные о производительности для гуманизованного scFv 16-02-B03-sc02

ID конструкции	Титр экспрессии [г/л]	Производительность		
		Выход партии [мг]	Объем рефолдинга [л]	Выход очистки [мг/мл]
16-02-B03-sc02	0,29	7,2	0,11	65,0

#### 1.2.2.2. Оценка стабильности.

Оценка конформационной стабильности, монодисперсности и структурной целостности конструкций scFv является неотъемлемым компонентом ранжирования различных молекул в отношении возможности их разработки. Предварительным этапом для корректного сравнения различных конструкций является получение очищенных молекул схожего качества. Критерий "чистота мономера", определенный методом эксклюзионной ВЭЖХ, предназначен для обеспечения сопоставимого качества различных исследуемых веществ. Помимо анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ, для определения чистоты и полноты белка проводили электрофорез в ПААГ с добавлением ДНС для подтверждения сопоставимого качества исследуемых препаратов.

Результаты эксклюзионной ВЭЖХ scFv показывают, что препарат может быть очищен до достижения содержания мономера по меньшей мере 96,9% (фиг. 2).

Характер тепловой денатурации кандидата-лидера исследовали методом дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) для обеспечения оценки молекулы в отношении ее ожидаемой конформационной стабильности. Нормализованный график исходных данных флуоресценции представлен на фиг. 3, где представлены результаты измерений для каждого образца в двух повторностях. Наблюдали кооперативный характер денатурации. Молекула 16-02-B03-sc02 продемонстрировала  $T_{m}$  86,4°C.

Во втором аспекте оценки стабильности монодисперсность молекулы контролировали в течение 4 недель при различных температурах. Результаты исследования стабильности и полученные содержания мономера представлены на фиг. 4. Молекула (16-02-B03-sc02) изначально имеет содержание мономера, превышающее минимум 95% мономера, и теряет менее 2,5% мономера относительно соответствующего исходного значения в концентрации 10 мг/мл. В замороженном состоянии при -20°C и <-65°C для образцов показаны лишь минимальные различия во времени. В наиболее жестких условиях (4°C) молекула 16-02-B03-sc02 потеряла всего 2,4% мономера в течение 4 недель. Помимо этого исследование устойчивости к внешним воздействиям проводили при температуре 37°C и концентрации scFv 10 мг/мл в срок до 4 недель. При этих условиях ожидается более сильное проявление различий в склонности к агрегации различных конструкций. Полученные данные, приведенные на фиг. 6 для 16-02-B03-sc02, свидетельствуют о потере примерно 20% мономера через 28 дней. scFv продемонстрировал хорошую стабильность мономера в условиях нагрузки. Хроматограммы исследования стабильности при 4°C приведены на фиг. 5, где показан образец в 0 день и через 28 дней при 4°C. В виде наложенного изображения на этой хроматограмме также показаны результаты стабильности при замораживании/оттаивании. Для этой части исследования образец неоднократно замораживали и оттаивали, всего проводили 5 циклов. Полученная количественная оценка содержания мономера с помощью аналитической эксклюзионной ВЭЖХ не выявила каких-либо изменений в указанном образце (табл. 5).

Для scFv был проведен анализ методом электрофореза в ПААГ с добавлением ДНС для получения

вспомогательных данных для количественной оценки с помощью поглощения УФ, подтверждающих чистоту исследуемого препарата и таким образом обеспечивающих специфичность количественного определения содержания. В другом аспекте этого анализа результаты электрофореза в ПААГ с добавлением ДНС выявили отсутствие деградации белка во время исследования стабильности (28 дней при 4°C и концентрации 10 мг/мл по сравнению с образцом в день 0, хранящимся при <-65°C), что является важной характеристикой с точки зрения возможности разработки.

Важно отметить, что различные исследования, проведенные в рамках этой оценки, касаются различных аспектов механизма устойчивости белка. Определение температуры тепловой денатурации белка позволит получить дополнительные данные для определения монодисперсности методом эксклюзионной ВЭЖХ при хранении при повышенной температуре. Хотя оба метода предназначены для получения оценки потенциального срока хранения и стабильности продукта, рассматриваемые механизмы глубоко различны. Средняя точка перехода ( $T_{пл}$ ), определенная с помощью тепловой денатурации, является качественной мерой стабильности домена белка (не позволяет термодинамически определить AG). Высокостабильные домены белка (с высокой  $T_{пл}$ ) с меньшей вероятностью подвергаются спонтанной денатурации при температуре окружающей среды и, следовательно, менее подвержены необратимой агрегации/преципитации, обусловленной взаимодействиями денатурированных доменов. Высокая стабильность домена указывает на плотную упаковку аминокислотных остатков, которая также коррелирует с устойчивостью к расщеплению протеазами. С другой стороны, оценка методом эксклюзионной ВЭЖХ обеспечивает количественное определение содержания мономерной фракции, а также растворимых олигомеров/агрегатов. Такие растворимые олигомеры часто представляют собой обратимые и относительно слабые ассоциаты, обусловленные электростатическими или гидрофобными взаимодействиями между правильно уложенными белками. Существует некоторая корреляция между  $T_{пл}$ , определенной с помощью тепловой денатурации, и склонностью к образованию олигомеров/агрегатов, определенной методом эксклюзионной ВЭЖХ, в частности для белков с "пограничной" стабильностью. До достижения определенного порога  $T_{пл}$ , составляющего примерно 60°C, варибельные домены антител, как правило, достаточно стабильны, чтобы быть устойчивыми к агрегации/преципитации и протеолитической деградации вследствие частичной денатурации домена при температуре окружающей среды. Однако олигомеризация, обусловленная гидрофобными и/или электростатическими взаимодействиями поверхностных остатков, все же происходит. Важно отметить, что при ускоренном (нагрузочном) исследовании стабильности при повышенной температуре (например, 37°C) различные механизмы образования олигомеров и преципитации могут действовать одновременно.

#### 1.2.3. Определение характеристик связывания и активности гуманизованного scFv *in vitro*.

В дальнейшем гуманизованный scFv был охарактеризован *in vitro* в отношении его свойств связывания с мишенью и активности. Анализировали кинетику связывания ( $k_a$ ,  $k_d$  и  $KD$ ) с ФНО $\alpha$  человека и способность к нейтрализации индуцированного ФНО $\alpha$  апоптоза фибробластов L929. Дополнительно определяли способность подавлять индуцированный ФНО $\alpha$  яванского макака (*Macaca fascicularis*) и макака-резуса (*Macaca mulatta*) апоптоз, а также способность подавлять взаимодействие ФНО $\alpha$  человека с TNFR1/TNFR2 методом ИФА и селективность в отношении мишени для связывания ФНО $\alpha$  по сравнению с ФНО $\beta$ .

Для понимания приведенных ниже результатов важно отметить, что как перенос CDR антитела кролика на каркас варибельного домена антитела человека, так и изменение формата от полноразмерного IgG до фрагмента scFv может влиять на фармакологические свойства. Например, определенная потеря аффинности обычно связана с гуманизацией. Кроме того, вследствие меньшего размера scFv по сравнению с IgG способность scFv препятствовать взаимодействию партнеров посредством стерического затруднения в значительной степени снижается. Последнее, но не менее важное, что следует отметить - вследствие бивалентного способа связывания с гомотримерным ФНО $\alpha$  аффинность исходного IgG может быть завышена (артефакт SPR). Следовательно, при сравнении аффинности исходного бивалентного IgG кролика и гуманизованного моновалентного scFv указанная "потеря аффинности" может быть переоценена.

##### 1.2.3.1. Аффинность.

Аффинность гуманизованного scFv к ФНО $\alpha$  человека определяли с помощью SPR (см. также 2.1.1). Аффинность определяли с использованием 2-кратных серийных разведений соответствующего scFv. scFv были получены из моноклонального антитела кролика. Был получен вариант scFv, названный "CDR" (CDR). scFv 16-02-B03-sc02 (CDR) связывался с аффинностью  $1,6 \times 10^{-10}$ М (см. табл. 7).

##### 1.2.3.2. Активность.

Способность гуманизованного scFv нейтрализовать ФНО $\alpha$  человека анализировали с использованием анализа с L929 (см. также 2.1.2). Способность ( $IC_{50}$  и  $IC_{90}$ ) к нейтрализации индуцированного ФНО $\alpha$  апоптоза анализировали для scFv, полученного из 16-02-B03, и сравнивали со способностью эталонного антитела-инфликсимаба, чтобы обеспечить прямое сравнение значений  $IC_{50}$  и  $IC_{90}$  в разных планшетах для анализа. Относительные значения  $IC_{50}$  и  $IC_{90}$  рассчитывали в единицах массы (нг/мл) инфликсимаба и scFv. Анализ активности выполняли несколько раз в разные дни с различными партиями

фрагментов антител. На фиг. 7 показаны типичные кривые зависимости ответа от дозы из одного эксперимента для указанного scFv. Средние значения параллельных определений представлены в табл. 7 (стандартные отклонения приведены в легенде таблицы).

Гуманизированный scFv подавлял индуцированный ФНО $\alpha$  апоптоз с более низкими значениями IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub>, чем инфликсимаб (см. табл. 7). Как и в случае исходного моноклонального антитела кролика, не наблюдалось четкой корреляции между аффинностью и активностью антитела (корреляция не приведена).

#### 1.2.3.3. Видовая перекрестная реактивность (ФНО $\alpha$ яванского макака и макака-резуса).

Видовую перекрестную реактивность для scFv определяли двумя способами: 1) определением способности к нейтрализации ФНО $\alpha$  яванского макака и макака-резуса в анализе с L929 и 2) определением аффинности к ФНО $\alpha$  яванского макака и макака-резуса методом SPR. Способность к нейтрализации ФНО $\alpha$  от различных видов определяли с помощью анализа с L929, подобно тому, как описано выше для ФНО $\alpha$  человека, с использованием ФНО $\alpha$  яванского макака и макака-резуса соответственно (см. также 2.1.2). ФНО $\alpha$  от обоих видов показали очень схожую способность индуцировать апоптоз L929 (данные не приведены). Таким образом, для исследования видовой перекрестной реактивности использовали одинаковые концентрации ФНО $\alpha$  человека и обезьян. Кроме того, определяли кинетику связывания (методом SPR) с ФНО $\alpha$  яванского макака и макака-резуса с использованием аналогичного анализа, как и для ФНО $\alpha$  человека (см. также 2.1.1).

scFv, полученный из клона 16-02-B03, демонстрировал перекрестную реактивность с ФНО $\alpha$  яванского макака и макака-резуса (см. табл. 7). Аффинность была схожей, а именно  $1,1 \times 10^{-9}$  и  $1,6 \times 10^{-9}$  М для яванского макака и макака-резуса соответственно (см. табл. 7 и фиг. 8). В целом, scFv, полученный из клона 16-02-B03, продемонстрировал видовую перекрестную реактивность с ФНО $\alpha$  яванского макака и макака-резуса.

#### 1.2.3.4. Блокирование взаимодействия ФНО $\alpha$ с TNFRI/II человека.

Помимо анализа с L929, способность гуманизированного scFv подавлять взаимодействие ФНО $\alpha$  человека с TNFRI/II оценивали с помощью ИФА (см. раздел 2.1.3). Аналогично анализу с L929, отдельные значения IC<sub>50</sub> в каждом планшете калибровали относительно IC<sub>50</sub> молекулы сравнения инфликсимаба, который также вносили в каждый планшет, и относительные значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> рассчитывали в единицах массы (нг/мл) инфликсимаба и scFv.

Анализ нейтрализации позволяет обнаружить отличия в активности целевых блокирующих антител только в том случае, если они связываются со своей мишенью с константой равновесия связывания (KD), которая превышает целевую концентрацию, используемую в анализе активности (KD > целевой концентрации). Для анализа с L929 использовали концентрацию ФНО $\alpha$ , составляющую 5 пМ, в то время как в ингибиторном ИФА с TNFRI/II использовали концентрацию ФНО $\alpha$ , составляющую 960 пМ. Таким образом, теоретически анализ с L929 позволяет различить активности scFv с KD > 5 пМ, тогда как ингибиторный ИФА позволяет различить лишь активности scFv с KD > 960 пМ.

16-02-B03-sc02 продемонстрировал способность блокировать взаимодействие ФНО $\alpha$  с TNFRI, в 1,2 раза большую по сравнению с инфликсимабом, тогда как способность по сравнению с инфликсимабом в анализе с L929 была в 1,7 раз выше. Подавление взаимодействия ФНО $\alpha$  с TNFRIII находилось в том же диапазоне, что и блокирование взаимодействия ФНО $\alpha$  с TNFRI. При сравнении относительных значений IC<sub>50</sub> для исходного IgG кролика (см. табл. 4) с относительными значениями IC<sub>50</sub> для гуманизированного scFv (табл. 7) активность scFv была несколько выше по сравнению с исходным IgG, хотя аффинность в целом находилась в том же диапазоне, что и для исходного IgG кролика. Поскольку активность антитела и scFv сравнивали в единицах массы, количество валентностей (сайтов связывания ФНО $\alpha$ ) для каждой концентрации было примерно в 2,9 раза выше для моновалентного scFv по сравнению с имеющим более чем в пять раз большую молекулярную массу, но бивалентным IgG. В случае scFv, связывающихся с очень высокой аффинностью, это приводит к более эффективному блокированию взаимодействия ФНО $\alpha$  и TNFRI/II, поскольку отсутствие avidности более не является определяющим для активности. Напротив, для низкоаффинных одновалентных доменов были опубликованы противоположные данные (Cortieters et al., *Arthritis & Rheumatism* 2006;54:1856-1866). По указанным выше причинам результаты ингибиторного ИФА не использовали для ранжирования активности антитела, но первоначально применяли для оценки способности антитела блокировать взаимодействие с TNFRI по сравнению с TNFRIII. Исследованный scFv блокировал взаимодействие с обоими рецепторами ФНО $\alpha$  с сопоставимыми активностями (табл. 9, фиг. 9 и фиг. 10).

#### 1.2.3.5. Специфичность в отношении мишени (селективность связывания с ФНО $\alpha$ по сравнению с ФНО $\beta$ ).

Специфичность scFv (16-02-B03-sc02) к ФНО $\alpha$  по сравнению с ФНО $\beta$  подтверждали путем оценки относительной способности ФНО $\beta$  по сравнению с ФНО $\alpha$  обеспечивать половину максимального подавления связывания ФНО $\alpha$  с scFv и определяли с помощью конкурентного ИФА (см. также раздел 2.1.4). Качество рекомбинантного ФНО $\beta$  человека было оценено производителем белка 1) в отношении чисто-

ты посредством электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН и анализа методом ВЭЖХ и 2) в отношении биологической активности в анализе цитотоксичности на клетках L929 мыши. Как показано на фиг. 11, взаимодействие scFv с биотинилированным ФНО $\alpha$  блокировалось немеченым ФНО $\alpha$  со значением IC<sub>50</sub>, находящимся в диапазоне от 100 до 200 нг/мл, тогда как ФНО $\beta$  не показал какого-либо значимого эффекта даже в самой высокой исследованной концентрации ФНО $\beta$  (1250 мкг/мл). Следовательно, scFv специфически связывается с ФНО $\alpha$ , но не с его ближайшим гомологом, ФНО $\beta$ . ФНО $\beta$  не показал какого-либо значимого подавления связывания ФНО $\alpha$  с scFv в исследованных концентрациях. Таким образом, концентрация ФНО $\beta$ , необходимая для обеспечения половины максимального подавления связывания ФНО $\alpha$ , должна быть значительно выше, чем наибольшая концентрация ФНО $\beta$ , использованная в анализе (1250 мкг/мл). При сравнении концентраций ФНО $\alpha$  и ФНО $\beta$ , необходимых для обеспечения половины максимального подавления связывания ФНО $\alpha$  с scFv, селективность связывания с ФНО $\alpha$  по сравнению с ФНО $\beta$  была значительно выше, чем в 10000 раз (см. также табл. 7). Поэтому связывание scFv вне мишени представляется весьма маловероятным. Результаты описанных выше экспериментов приведены в табл. 7-9.

CDR: "трансплантат CDR". Анализ активности выполняли несколько раз в разные дни с различными партиями фрагментов антитела со следующими стандартными отклонениями: 16-02-B03-sc02 (n = 2): отн. IC<sub>50</sub> = 1,7 ± 0,3 и отн. IC<sub>90</sub> = 1,7 ± 0,7 (табл. 7).

Таблица 7. Способность связывания и активность гуманизованного scFv in vitro

scFv	Дизайн	Аффинность к ФНО $\alpha$ человека	Аффинность к ФНО $\alpha$ яванского макака	Аффинность к ФНО $\alpha$ макака-резуса	Активность	Видоспецифичность IC <sub>50</sub> [нг/мл]	Специфичность к мишени отн. IC <sub>50</sub> для ФНО $\beta$ по сравнению с ФНО $\alpha$													
								k <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	KD (M)	k <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	KD (M)	k <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	KD (M)	отн. IC <sub>50</sub> *	отн. IC <sub>90</sub> &	чел. овек	яванский макак
16-02-B03-sc02	CDR	4,1E+05	6,6E-05	1,6E-10	1,8E+05	2,1E-04	1,1E-9	1,3E+05	2,2E-04	1,6E-9	1,7	1,7	6,9	99,3	71,8	>> 10000				

\*: IC<sub>50,инфликсимаб</sub> (нг/мл)/IC<sub>50,scFv</sub> (нг/мл) &: IC<sub>90,инфликсимаб</sub> (нг/мл)/IC<sub>90,scFv</sub> (нг/мл).

Таблица 8. Описание гуманизованного scFv согласно данному изобретению

	Экспрессия	Производительность	Стабильность		
			Тепловая денатурация		Потеря мономера при концентрации 10 г/л через 4 нед. при 4 °C (-65, -20)
	[г/л]	[мл/л]	[°C]	[Δ %]	[Δ %]
16-02-B03-sc02	0,29	65,0	86,4	2,3 (0,0, 0,0)	0,0

Таблица 9. Способность scFv 16-22-B02-sc02 блокировать взаимодействие ФНО с TNFR1 и ФНО с TNFR2.

scFv	Блокирование взаимодействия ФНО $\alpha$ с TNFR1				Блокирование взаимодействия ФНО $\alpha$ с TNFR2			
	отн. IC <sub>50</sub> *	отн. IC <sub>90</sub> &	IC <sub>50</sub> [нг/мл]	IC <sub>90</sub> [нг/мл]	отн. IC <sub>50</sub> *	отн. IC <sub>90</sub> &	IC <sub>50</sub> [нг/мл]	IC <sub>90</sub> [нг/мл]
16-02-B03-sc02	1,2	0,6	73,7	489,9	1,4	0,4	79,5	474,4

\*: IC<sub>50,инфликсимаб</sub> (нг/мл)/IC<sub>50,scFv</sub> (нг/мл) &: IC<sub>90,инфликсимаб</sub> (нг/мл)/IC<sub>90,scFv</sub> (нг/мл).

## 2. Способы.

### 2.1. Анализ характеристик "лидера".

#### 2.1.1. Определение кинетики связывания и видовой перекрестной реактивности методом SPR.

Аффинность связывания scFv с ФНО $\alpha$  человека определяли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием прибора для SPR MASS-1 (Sierra Sensors). Эффективность исследования методом SPR была подтверждена с помощью анализа взаимодействия эталонного антитела с антигеном, такого как взаимодействие цертолизумаба с ФНО $\alpha$ . Пегилированный Fab-фрагмент цертолизумаба был выбран в качестве эталона вследствие его моновалентного способа связывания, аналогичного способу связывания scFv. При использовании тех же условий проведения анализа, что и для определения аффинности scFv, было определено значение аффинности цертолизумаба к ФНО $\alpha$ , составляющее 9,94×10<sup>-11</sup> М. Это значение хорошо согласуется с опубликованными значениями KD, составляющими 9,02±1,43×10<sup>-11</sup> М (заявка на лицензирование биопрепарата (BLA) цертолизумаба; номер BLA: 125160; дата подачи: 30 апреля 2007 г.).

Для определения аффинности scFv ФНО $\alpha$  человека (Peprotech, номер по каталогу 300-01) иммобилизовали на сенсорном чипе (SPR-2 Affinity Sensor, Amine, Sierra Sensors) путем конъюгации аминов до достижения уровня иммобилизации от 50 до 100 резонансных единиц (RU) (уровни иммобилизации, достигнутые в процессе проведения анализа SPR, составляли от 40 до 120 RU). На первой стадии проводили скрининг аффинности scFv с применением только одной концентрации scFv (90 нМ). На второй стадии определяли кинетические характеристики в цикле с однократной инъекцией (single injection cycle

kinetics; SiCK), используя цикл с однократной инъекцией путем одновременного введения шести анализируемых образцов в различных концентрациях в каждый из восьми параллельных каналов системы MASS-1. Для скрининга аффинности гуманизованный scFv вводили в проточные ячейки в концентрации 90 нМ в течение трех минут и контролировали процесс диссоциации в течение 12 мин. Для последующих более точных определений аффинности в проточные ячейки в течение трех минут вводили двукратные серийные разведения scFv в диапазоне от 45 до 1,4 нМ и оставляли на 12 мин для протекания диссоциации белка из комплекса с ФНО $\alpha$ , иммобилизованного на сенсорном чипе. Кажущиеся константы скорости диссоциации ( $k_d$ ) и ассоциации ( $k_a$ ) и кажущуюся константу равновесия диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали с помощью программного обеспечения для анализа MASS-1 (Analyzer, Sierra Sensors) с применением модели связывания Лэнгмюра "один к одному", а качество аппроксимации контролировали на основании критерия  $\chi^2$ , который является мерой качества подбора кривой. Чем меньше значение  $\chi^2$ , тем более точной является аппроксимация к модели связывания Лэнгмюра "один к одному". Для скрининга аффинности результаты признавали значимыми, если  $\chi^2$  составлял менее 10 для анализируемой концентрации. В тех случаях, когда анализировали несколько концентраций scFv, результаты признавали значимыми, если среднее значение  $\chi^2$  по всем исследованным концентрациям составляло менее 10. Критерии приемлемости были соблюдены для исследованного scFv.

Видовую перекрестную реактивность с ФНО $\alpha$  (Peprotech, номер по каталогу 315-01A) яванского макака (Sino Biological, номер по каталогу 90018-CNAE) и макака-резуса (R&D Systems, номер по каталогу 1070-RM-025/CF) определяли с применением тех же условий проведения анализа и тех же показателей качества, которые описаны выше для ФНО $\alpha$  человека. Для ФНО $\alpha$  яванского макака и макака-резуса были достигнуты уровни иммобилизации, находящиеся в диапазоне от 50 до 180 RU и от 90 до 250 RU, соответственно. ScFv анализировали с применением двукратных серийных разведений с концентрациями, составляющими от 45 до 1,4 нМ. Средние значения  $\chi^2$  составляли менее 10 для всех исследованных scFv.

2.1.2. Индуцированный ФНО апоптоз в фибробластах L929 (нейтрализация ФНО $\alpha$  человека и ФНО $\alpha$  приматов, не являющихся человеком, под действием scFv).

Способность scFv нейтрализовать биологическую активность рекомбинантного ФНО $\alpha$  человека оценивали с использованием фибробластов мыши L929 (ATCC/LGC Standards, номер по каталогу CCL-1). Клетки L929 сенсibilizировали к индуцированному ФНО апоптозу путем добавления 1 мкг/мл активномидина D. Трехкратные серийные разведения эталонного антитела к ФНО $\alpha$  или scFv (3000-0,05 нг/мл) и 5 пМ рекомбинантного ФНО $\alpha$  человека (Peprotech, номер по каталогу 300-01) предварительно инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Используемая концентрация ФНО $\alpha$  (5 пМ) индуцировала субмаксимальный апоптоз ( $EC_{90}$ ) клеток L929. После добавления смесей агонистов/ингибиторов клетки инкубировали в течение 24 ч. Выживаемость клеток определяли посредством колориметрического анализа с применением реагента для детекции пролиферации клеток WST-8 (2-(2-метокси-4-нитрофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-(2,4-дисульфопенил)-2Н-тетразолий, моносодиевая соль) (Sigma Aldrich, номер по каталогу 96992). WST-8 восстанавливается под действием дегидрогеназ клетки с образованием оранжевого продукта формазана. Количество образующегося формазана прямо пропорционально количеству живых клеток. Данные анализировали с применением четырехпараметрической логистической модели для подбора кривой, используя программное обеспечение для анализа данных Softmax (Molecular Devices), и рассчитывали концентрацию эталонного антитела или scFv, необходимую для нейтрализации индуцированного ФНО $\alpha$  апоптоза на 50 и 90% ( $IC_{50}$  и  $IC_{90}$ ) (см. также фиг. 7). Для обеспечения возможности непосредственного сравнения значений  $IC_{50}$  и  $IC_{90}$  между экспериментами, которые были проведены в разные дни или в разных планшетах для анализа, значения  $IC_{50}$  и  $IC_{90}$  калибровали относительно эталонного антитела, представляющего собой инфликсимаб. Для контроля точности ответа кривые зависимости ответа от дозы анализировали в двух повторностях. Стандартные отклонения и коэффициенты вариации (КВ) рассчитывали для каждой экспериментальной точки (КВ < 20%).

Видовую перекрестную реактивность с ФНО $\alpha$  яванского макака (Sino Biological, номер по каталогу 90018-CNAE) и макака-резуса (R&D Systems, номер по каталогу 1070-RM-025/CF) определяли с применением тех же условий проведения анализа и тех же показателей качества, которые описаны выше для ФНО $\alpha$  человека. Как и в случае аналога из организма человека, для исследования видовой перекрестной реактивности использовали концентрации ФНО $\alpha$ , которые индуцировали субмаксимальный апоптоз ( $EC_{90}$ ) в клетках L929. ФНО $\alpha$  обоих видов демонстрировал способность индуцировать апоптоз в фибробластах мыши L929, очень сходную с аналогичной способностью ФНО $\alpha$  человека. Следовательно, для обоих исследуемых видов использовали ту же концентрацию ФНО $\alpha$  (5 пМ). При проведении анализа видовой перекрестной реактивности значения КВ для большинства повторных экспериментальных точек составляли менее 10%.

2.1.3. Ингибиторный ИФА ФНО $\alpha$ .

Ингибирующее действие scFv на связывание с лигандами оценивали с применением ИФА, биохимического метода, воспроизводящего исключительно взаимодействие ФНО $\alpha$  с TNFR1 и TNFR2.

В случае первого ингибиторного ИФА внеклеточный домен TNFR1, слитый с Fc-фрагментом IgG человека (R&D Systems, номер по каталогу 372-RI), наносили на 96-луночный планшет для ИФА Maxisorp в концентрации 0,5 мкг/мл. В случае второго ингибиторного ИФА внеклеточный домен TNFR2, слитый с Fc-фрагментом IgG человека (R&D Systems, номер по каталогу 726-R2), наносили в концентрации 2 мкг/мл. Все последующие этапы были идентичными для обоих анализов. Для детекции связывания ФНО $\alpha$  с TNFR1 и TNFR2 ФНО $\alpha$  биотинилировали перед применением. Биотинилированный ФНО $\alpha$  человека (960 пМ, 50 нг/мл) сначала инкубировали со взятым в трехкратных серийных разведениях гуманизированным scFv к ФНО $\alpha$  и инфликсимабом (10000 нг/мл-0,2 нг/мл) в течение 1 ч при комнатной температуре. Смеси ФНО $\alpha$ /фрагмент антитела переносили в планшеты, содержащие иммобилизованный рецептор ФНО, и детектировали связывание незаблокированного ФНО $\alpha$  с иммобилизованным рецептором ФНО $\alpha$  после инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре с помощью биотинсвязывающего конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена (стрептавидин-HRP) (SDT Reagents, номер по каталогу SP40C). Добавление субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) приводило к получению считываемых колориметрически показаний, пропорциональных связыванию ФНО $\alpha$  с TNFR1 и TNFR2. Перед применением в конкурентном ИФА биологическую активность биотинилированного ФНО $\alpha$  подтверждали в анализе с L929. EC<sub>50</sub> биотинилированного ФНО $\alpha$  была аналогична EC<sub>50</sub> немеченого ФНО $\alpha$  (данные не приведены). Аналогично описанному выше анализу L929, данные анализировали с применением четырехпараметрической логистической модели для подбора кривой, используя программное обеспечение для анализа данных Softmax (Molecular Devices), и рассчитывали концентрацию scFv, необходимую для подавления взаимодействия ФНО $\alpha$  с TNFR на 50 и 90% (IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub>). Для обеспечения возможности непосредственного сравнения значений IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> между экспериментами, которые были проведены в разные дни или в разных планшетах для анализа, значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> калибровали относительно эталонного антитела, представляющего собой инфликсимаб.

Для контроля точности ответа кривые зависимости ответа от дозы анализировали в двух повторностях. Стандартные отклонения и КВ рассчитывали для каждой экспериментальной точки (КВ <25%).

#### 2.1.4. Специфичность в отношении мишени.

Для подтверждения специфичности scFv к ФНО $\alpha$  оценивали связывание с наиболее гомологичным членом семейства ФНО $\beta$ . Способность немеченого ФНО $\beta$  (Peprotech, номер по каталогу 300-01B) и ФНО $\alpha$  (Peprotech, номер по каталогу 300-01) подавлять взаимодействие биотинилированного ФНО $\alpha$  с scFv анализировали с помощью конкурентного ИФА. С этой целью scFv наносили на 96-луночный планшет для проведения ИФА Maxisorp в концентрации 1 мкг/мл. Связывание биотинилированного ФНО $\alpha$  (75 нг/мл) с нанесенным на планшет scFv в присутствии взятых в пятикратных серийных разведениях немеченого ФНО $\alpha$  (50 мкг/мл-0,00013 мкг/мл) или ФНО $\beta$  (1250 мкг/мл-0,00013 мкг/мл) детектировали с применением биотинсвязывающего конъюгата стрептавидин-HRP (SDT Reagents, номер по каталогу SP40C), как описано выше. При построении кривой зависимости ответа от дозы для ФНО $\alpha$  данные анализировали с применением четырехпараметрической логистической модели для подбора кривой, используя программное обеспечение для анализа данных Softmax (Molecular Devices), и рассчитывали концентрацию немеченого ФНО $\alpha$ , необходимую для блокирования взаимодействия биотинилированного ФНО $\alpha$  с нанесенным на планшет scFv на 50% (IC<sub>50</sub>). ФНО $\beta$  не показал какого-либо значимого подавления взаимодействия биотинилированного ФНО $\alpha$  с scFv (см. также фиг. 11). Для количественного определения относительной способности ФНО $\beta$  по сравнению с ФНО $\alpha$  подавлять связывание ФНО $\alpha$  с каждым scFv рассчитывали IC<sub>50</sub>, характеризующую подавление взаимодействия под действием ФНО $\beta$  относительно ФНО $\alpha$ . Поскольку при использовании ФНО $\beta$  в концентрациях, приблизительно в 5000-20000 раз превышающих IC<sub>50</sub> для ФНО $\alpha$ , не наблюдали какого-либо значимого ингибирования, было определено, что селективность связывания с ФНО $\alpha$  превышает селективность связывания с ФНО $\beta$  более чем в 10000 раз. Для контроля точности ответа кривую зависимости ответа от дозы анализировали в двух повторностях. Стандартные отклонения и КВ рассчитывали для каждой экспериментальной точки (КВ < 25% для всех, кроме одной из исследованных концентраций ФНО $\alpha$ / $\beta$ ). scFv удовлетворял этому критерию.

2.2. Обработка и анализ данных по химическим свойствам, процессу производства и контролю качества (chemistry, manufacturing and controls; СМС).

#### 2.2.1. Восстанавливающий электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН) представляет собой метод анализа, применяемый для качественной характеристики и контроля чистоты белков. Согласно Фармакопее США (United States Pharmacopeia; USP) (Глава 1056 Фармакопии США), аналитический гель-электрофорез является подходящим и рутинным способом идентификации и оценки гомогенности белков в лекарственных веществах.

Данный метод применяют для определения количества продукта scFv в лизатах *E. coli* для установления выхода продукта экспрессии после ферментации. Другим применением этого метода является проверка подлинности исследуемых веществ, основанная на определении их молекулярной массы относи-

тельно теоретических значений. Во вспомогательных целях этот метод применяют для количественной оценки чистоты исследуемых образцов с точки зрения наличия примесей, связанных с процессом получения (белков клетки-хозяина), и примесей, связанных с продуктом (продукты разложения или аддукты).

Исследования методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН проводили с помощью коммерчески доступной сборной системы для приготовления гелей "Mini Protean", приобретенной у компании Bio-Rad Laboratories Inc. Гуманизированный scFv анализировали на разделяющих гелях типа "Any kD" (номер по каталогу 456-9036). В обоих случаях использовали буферную систему трис/глицин, рекомендованную производителем. Для детекции белковых зон применяли либо окрашивание Кумасси с применением раствора для окрашивания SimplyBlue™ (Life Technologies Corp., номер по каталогу LC6060), либо окрашивание серебром с применением набора Pierce Silver Stain Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 24612). При проведении процедур окрашивания следовали протоколам соответствующей компании-поставщика.

Документирование и анализ окрашенных белковых гелей проводили с применением системы для документирования ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories Inc., номер по каталогу 170-8265) и программного обеспечения Image Lab, версия 4.0.1 (Bio-Rad Laboratories Inc., номер по каталогу 170-9690).

#### **Определение титра в образцах лизатов**

Электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН обеспечивает специфическую детекцию целевого белка в смеси белков клетки-хозяина. На каждый гель наносили серийные разведения стандартного образца в линейном диапазоне метода (который был определен заранее). Для расчета стандартной кривой, которую, в свою очередь, использовали для экстраполяции содержания scFv в образце, применяли линейную регрессию интенсивностей зон (измеренных посредством денситометрии) в зависимости от номинальных концентраций стандартного образца.

Образцы лизатов с неизвестными концентрациями продукта наносили в различных разведениях (по меньшей мере 1:10 в буфере для разведения) таким образом, чтобы по меньшей мере одна концентрация scFv находилась в линейном диапазоне метода. Количество продукта рассчитывали на основе измеренных интенсивностей зон scFv, и концентрацию определяли с использованием кратностей разведения препарата образца. Значения усредняли для всех образцов, которые находились в пределах линейного диапазона стандартной кривой.

В качестве дополнительной проверки пригодности данного метода для количественного определения в образцах лизатов проводили анализ подавления/ усиления сигнала путем добавления в образец лизата известного количества стандартного образца. Расчет степени извлечения при разведении образца 1:10 в буфере для разведения приводил к значению 95,4%, которое находится на том же уровне точности, что и наблюдаемое значение для стандартного образца в буфере для разведения. Таким образом, не наблюдали какой-либо существенной интерференции с матриксом в клеточных лизатах, и этот метод считали подходящим для количественного определения содержания scFv в клеточных лизатах.

#### **Содержание и чистота белков**

Для того чтобы показать пригодность метода для определения содержания и, следовательно, также чистоты исследуемых образцов, нижний предел обнаружения (НПО) для эталонного scFv определяли визуально (путем идентификации белковой зоны) при номинальной нагрузке 0,02 мкг, при этом оценка гистограммы интенсивности для соответствующей дорожки показывала, что отношение сигнал/шум при этой нагрузке составляло приблизительно 2. Кроме того, линейный диапазон для количественной оценки определяли путем денситометрического анализа основных зон.

Аппроксимация данных методом линейной регрессии приводила к коэффициенту смешанной корреляции ( $R^2$ ), составляющему 0,9998, что указывало на хорошее качество аппроксимации. В дополнение к общему качеству аппроксимации определяли относительную ошибку для каждой отдельной экспериментальной точки с целью подтверждения пригодности способа в выбранном диапазоне. Относительные ошибки составляли менее 10% для всех экспериментальных точек, что указывало на хорошую точность этого способа.

##### **2.2.2. Поглощение УФ излучения при 280 нм.**

Метод измерения поглощения УФ излучения при 280 нм представляет собой анализ содержания общего белка, как описано в Главе 1057 Фармакопеи США. Растворы белков поглощают УФ излучение с длиной волны 280 нм благодаря наличию ароматических аминокислот. Поглощение УФ излучения зависит от содержания остатков тирозина и триптофана в белке и пропорционально концентрации белка. Поглощение раствора с неизвестным содержанием белка может быть определено, в соответствии с Главой 851 Фармакопеи США, посвященной спектроскопии, путем применения закона Бера:  $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ , где поглощение ( $A$ ) равно произведению молярного коэффициента поглощения ( $\epsilon$ ), длины оптического пути и концентрации вещества. Молярный коэффициент поглощения для scFv рассчитывали с помощью программного обеспечения Vector NTI® (Life Technologies Corporation).

Измерение поглощения УФ излучения проводили с применением ридера Infinity M200 Pro, оснащенного планшетом Nanoquant (Tecan Group Ltd.). Поглощение образцов белка измеряли при 280 нм и 310 нм, при этом последняя длина волны служила базовым сигналом, который вычитали из сигнала на

280 нм. Для учета возможной интерференции с матриксом образцов для каждого измерения выполняли вычитание сигнала контрольной пробы. Полученный итоговый сигнал поглощения образца белка использовали для расчета концентрации белка с применением закона Ламберта-Бера.

Все измерения проводили в пределах диапазона, указанного в спецификациях к приборам, в диапазоне измерения 0-4 единицы ОП, для которого производитель указывает воспроизводимость <1% и единичности измерений <3%.

### 2.2.3. Эксклюзионная ВЭЖХ (эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография).

Эксклюзионная ВЭЖХ представляет собой метод разделения, основанный на применении твердой неподвижной фазы и жидкой подвижной фазы, как указано в главе 621 Фармакопеи США. Этот метод обеспечивает разделение молекул на основе их размера и формы за счет применения гидрофобной неподвижной фазы и водной подвижной фазы. Разделение молекул происходит между мертвым объемом ( $V_0$ ) и полным объемом растворителя ( $V_T$ ) конкретной колонки. Определение посредством эксклюзионной ВЭЖХ проводили в системе для ВЭЖХ Chromaster (Hitachi High-Technologies Corporation), оснащенной устройством для автоматического ввода образцов и УФ-детектором, настроенным на длину волны детектирования 280 нм. Управление оборудованием осуществляли с помощью программного обеспечения EZChrom Elite (Agilent Technologies, версия 3.3.2 SP2), которое также поддерживает функцию анализа полученных хроматограмм. Образцы белка доводили до прозрачного состояния путем центрифугирования и хранили при температуре 6°C в автодозаторе до введения. Для анализа образцов ScFv использовали колонку Shodex KW402.5-4F (Showa Denko Inc, номер по каталогу F6989201) со стандартным соевым буфером в качестве подвижной фазы (50 мМ ацетат натрия pH 6,0, 250 мМ хлорид натрия) при рекомендуемой скорости потока 0,35 мл/мин. Количество целевого образца на каждое введение пробы составляло 5 мкг. Детекцию образцов осуществляли с помощью УФ-детектора при длине волны 280 нм, и данные регистрировали с применением подходящего пакета программного обеспечения. Полученные хроматограммы анализировали в диапазоне от  $V_0$  до  $V_T$ , исключая таким образом пики, связанные с матриксом, со значением времени элюирования >10,4 мин.

С целью обеспечения внутрилабораторной воспроизводимости метода регулярно проводили измерения для стандартного образца в начале и в конце каждого процесса ВЭЖХ. Стандартный образец, используемый для проверки пригодности этой системы, представлял собой ScFv, который был получен в виде одной порции и разделен на аликвоты, используемые для измерения в каждой временной точке.

### 2.2.4. ДСФ (дифференциальная сканирующая флуориметрия).

Метод ДСФ представляет собой нефармакопейный способ измерения зависимой от температуры денатурации белка. Измерение температуры тепловой денатурации методом ДСФ проводили с помощью аппарата для количественной ПЦР MX3005P (Agilent Technologies), управляемого пакетом программного обеспечения MX Pro (Agilent Technologies) и оснащенного фильтром возбуждения/эмиссии, установленным на 492/610 нм. Реакции проводили в белых планшетах для ПЦР Thermo fast 96 (Abgene, номер по каталогу AB-0600/W). Для детекции денатурации белка использовали коммерчески доступный стоковый раствор красителя SYPRO orange (Molecular Probes; номер по каталогу S6650) в конечном разведении 1:1000. Образцы белка разводили для измерений денатурации до конечной концентрации 50 мкг/мл в стандартном буферном солевом растворе. Тепловую денатурацию осуществляли с помощью запрограммированного изменения температуры, начинающегося с 25°C и доводимого до 96°C с шагом 1°C с продолжительностью 30 с. В процессе запрограммированного изменения температуры регистрировали эмиссию флуоресценции каждого образца. Зарегистрированные необработанные данные обрабатывали и оценивали с применением пакета шаблонов Microsoft Excel (Niesen, Nature Protocols 2007, Vol. 2 No.9), и данные по флуоресценции аппроксимировали с помощью уравнения Больцмана с применением программы GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) для получения средней точки температурного перехода ( $T_m$ ).

Для обеспечения надежных и устойчивых к ошибкам измерений средней точки денатурации измерения выполняли по меньшей мере в двух повторностях. Что касается качества данных, то учитывали лишь измерения с качеством аппроксимации ( $R^2$ ) > 0,9900 и 95% доверительным интервалом для  $T_m$  менее 0,5%.

Для оценки внутрилабораторной воспроизводимости в каждое измерение включали стандартный образец (известный охарактеризованный scFv), что обеспечивало возможность сравнения результатов выполнения анализа в разные дни.

### 2.2.5. Исследование стабильности.

Для оценки стабильности scFv в качестве регистрируемого показателя пригодности указанной молекулы для дальнейших разработок был создан протокол краткосрочного исследования стабильности. Конструкцию белка концентрировали в простом буферном солевом составе (см. выше) до целевых концентраций, составляющих 1 и 10 мг/мл. Содержание мономера определяли посредством эксклюзионной ВЭЖХ для подтверждения того, что чистота превышает требуемый критерий, составляющий > 95%. Далее образец белка хранили при температуре < -65, -20, 4 и 37°C в течение 4 недель, и аликвоты анализировали в различные моменты времени. Первичный регистрируемый показатель представлял собой анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ, который обеспечивал количественное определение растворимых олиго-

меров и агрегатов с более высокой молекулярной массой. В качестве вспомогательных измерений определяли содержание белка по поглощению УФ излучения при 280 нм, которое позволяло судить о том, происходила ли в течение периода хранения потеря существенных количеств белка за счет осаждения. Для хранения использовали пробирки с завинчивающейся крышкой (Sarstedt, номер по каталогу 72.692.005), которые заполняли количествами 30-1500 мкг на каждую аликвоту. Кроме того, определяли чистоту посредством электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН, который свидетельствовал о стабильности конструкции в отношении деградации или ковалентной мультимеризации.

Пример 3. Получение гуманизированного диатела и IgG.

Конструкцию одноцепочечного диатела разрабатывают путем расположения переменных доменов в конфигурации VLA-L1-VNB-L2-VLB-L3-VHA. В этих конструкциях домены VLA и VHA и VLB и VNB совместно образуют сайт связывания для ФНО $\alpha$ . Пептидные линкеры L1-L3, соединяющие переменные домены, были сконструированы из повторов глицин/серин. Два коротких линкера L1 и L3 состоят из единственного повтора G4S, тогда как длинный линкер L2 состоит из последовательности (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>. Нуклеотидные последовательности, кодирующие гуманизированные переменные домены (пример 2; раздел 1.2.1.), синтезируют de novo и клонируют в адаптированный вектор для экспрессии в E. coli, полученный на основе последовательности плазмиды pET26b(+) (Novagen). Экспрессию и очистку осуществляют, как описано для scFv в примере 2; разделе 1.2.1.

Гуманизированный IgG конструируют путем клонирования переменных доменов в подходящий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих для транзитной гетерологичной экспрессии, содержащий лидерную последовательность и соответствующие константные домены, например, векторы pFUSE-rIgG (Invivogen). Транзитную экспрессию функционального IgG осуществляют путем совместной трансфекции векторов, кодирующих тяжелую и легкую цепи, в клетки CHO S с применением системы FreeStyle™ MAX. После культивирования в течение нескольких дней собирают для очистки супернатант клеток, секретирующих антитела. Далее секретируемые IgG подвергают аффинной очистке на сорбенте белок А-сефароза (GE Healthcare). Элюированные фракции анализируют посредством электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН, измерения поглощения УФ излучения при 280 нм и эксклюзионной ВЭЖХ.

Аффинности молекул антитела определяют с использованием прибора Biacore, как описано в примере 2 в разделе 2.1.1).

Активности молекул антитела определяют в анализе с L929 (способ описан в примере 2 в разделе 2.1.2).

Пример 4. Определение стехиометрии связывания ФНО $\alpha$

Стехиометрию связывания 16-02-B03-sc02 с ФНО $\alpha$  определяли с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. 16-02-B03-sc02-scFv и ФНО $\alpha$  инкубировали в двух разных молярных отношениях, а именно в молярном отношении 1:1 и 4,5:1. Поскольку ФНО $\alpha$  существует в растворе в виде тримера, указанные молярные отношения относятся к ФНО $\alpha$ <sub>тример</sub>. Таким образом, в отношении 4,5:1 16-02-B03-scFv находится в избытке и должен занимать все точки связывания ФНО $\alpha$ <sub>тример</sub>, в результате чего образуются комплексы 1 ФНО $\alpha$ <sub>тример</sub> с 3 scFv. Однако в условиях эквимольного отношения имеющегося scFv не достаточно для насыщения всех трех теоретических сайтов связывания ФНО $\alpha$ . Поэтому, также были ожидаемыми варианты комплекса с менее чем 3 связанными scFv. ФНО $\alpha$  и 16-02-B03-scFv инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре для обеспечения образования комплекса. Затем образцы центрифугировали при 4°C в течение 10 мин. 10 мкл каждого образца анализировали посредством эксклюзионной ВЭЖХ. Анализ с помощью эксклюзионной ВЭЖХ проводили с 50 mM фосфатным буфером pH 6,5, 300 mM NaCl в качестве элюента при скорости потока 0,35 мл/мин. Элюированные пики белка детектировали на длине волны 280 нм. Колонку заранее калибровали с применением калибровочного набора для гелефильтрации от компании GE Healthcare (низкомолекулярные стандарты, высокомолекулярные стандарты) для определения кажущихся молекулярных масс.

На нижней панели фиг. 12 показан профиль элюции для эквимольных количеств scFv и ФНО $\alpha$ , который перекрывался с профилями ФНО $\alpha$ <sub>тример</sub> и scFv, взятых по отдельности. Вследствие тримеризации ФНО $\alpha$  в растворе теоретически существует до трех эквивалентных сайтов связывания для scFv, присутствующих в каждом тримере, и, следовательно, молекулы scFv являются лимитирующими. В этих условиях были идентифицированы все три вида комплекса (3:1, 2:1, 1:1). На верхней панели фиг. 12 показан профиль элюции комплекса с избыточными количествами scFv. Избыток несвязанного scFv элюировался с ожидаемым значением времени удерживания. Пик ФНО $\alpha$  количественно расходовался на образование комплексов и полностью исчезал. Пик этого комплекса смещался в сторону более низких значений времени удерживания и хорошо коррелировал со временем удерживания пика с наибольшей молекулярной массой, полученного в условиях эквимольного отношения. По этой причине было сделано заключение, что все доступные сайты связывания на молекуле ФНО $\alpha$  были заняты scFv, и, следовательно, стехиометрия связывания составляет 3:1 (scFv:ФНО $\alpha$ ), если scFv доступен в избытке.

В дополнение к этим качественным наблюдениям, кажущуюся стехиометрию связывания также

рассчитывали на основе кажущейся молекулярной массы комплекса 16-02-B03-scFv:ФНО $\alpha$ , определенной посредством эксклюзионной ВЭЖХ. На основании времени удерживания было рассчитано, что кажущаяся молекулярная масса составляла 123,6 кДа. Согласно приведенному ниже уравнению (1) было рассчитано, что кажущаяся стехиометрия связывания составляла 2,7. Это хорошо коррелирует с теоретическим числом трех эквивалентных сайтов связывания, доступных для scFv на молекуле ФНО $\alpha$ <sub>пример</sub>, и приведенными выше наблюдениями, согласно которым была определена стехиометрия связывания 3:1.

Уравнение (1):

стехиометрия связывания (scFv:ФНО $\alpha$ ) = (молекулярная масса (комплекс, каж.) - молекулярная масса (ФНО $\alpha$ , теор.))/молекулярная масса (scFv, теор.),  
 молекулярная масса (комплекс, каж.): 123,6 кДа,  
 молекулярная масса (ФНО $\alpha$ , теор.): 52,2 кДа,  
 молекулярная масса (scFv, теор.): 26,5 кДа.

Пример 5. Образование комплексов ФНО $\alpha$ :антитело (перекрестное связывание ФНО $\alpha$ ).

Способность диатела 16-02-B03 связываться одновременно с двумя молекулами ФНО $\alpha$  исследуют на приборе Biacore T200 в буфере HEPES, содержащем 10 mM HEPES, 150 mM NaCl и 0,05% Гвин. Биотинилированный ФНО $\alpha$  (Acro Biosystems) захватывают с помощью биотинилированного олигонуклеотида на основе одноцепочечной ДНК с применением набора Biotin CAPture (GE Healthcare) в соответствии с инструкциями производителя. 0,25 мкг/мл биотинилированного ФНО $\alpha$  вводят со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 3 мин для достижения уровня захвата, составляющего приблизительно от 200 до 300 RU (резонансных единиц). Указанное диатело и 16-02-B03-scFv, в качестве контроля, вводят сверху поверхности, содержащей иммобилизованный ФНО $\alpha$ , в течение 2 мин при скорости потока 30 мкл/мин в концентрации 90 нМ. После ассоциации фрагментов антитела вводят ФНО $\alpha$  (Perrotech) в течение 5 мин при скорости потока 30 мкл/мин в концентрации 90 нМ. Концентрации антител и ФНО $\alpha$  выбирают близко к насыщению связывания. Измерение проводят при 25°C. Бивалентное диатело 16-02-B03, как ожидается, будет связывать две молекулы ФНО $\alpha$  одновременно, тогда как моновалентный 16-02-B03-scFv, как и ожидалось, связывается только с одной молекулой ФНО $\alpha$ .

Дополнительно образование комплексов ФНО $\alpha$ -антитела может быть оценено при различных отношениях ФНО $\alpha$  и форм антител 16-02-B03 с применением эксклюзионной ВЭЖХ. 16-02-B03-IgG (150 кДа) и 16-02-B03-scDb (~52 кДа) инкубируют с ФНО $\alpha$  (52 кДа) в разных молярных отношениях (1:3, 1:1, 3:1) относительно количества сайтов связывания. Таким образом, IgG и scDb содержат 2, а ФНО $\alpha$  содержит 3 сайта связывания. Смеси антитело-ФНО $\alpha$  инкубируют в течение по меньшей мере 30 мин при 37°C, охлаждают в течение 10 мин при комнатной температуре и хранят в течение ночи при 2-8°C. От 5 до 10 мкл смеси белков с концентрацией приблизительно 1 мг/мл вводят в колонку TOSHO TSKgel UP-SW3000. Анализ проводят с 150 mM фосфатным буфером pH 6,8, 100 mM NaCl в качестве элюента при скорости потока 0,3 мл/мин. Элюированные пики белков детектируют при длине волны 214 нм. Колонку заранее калибруют с использованием стандартной смеси белков VEN450 SEC (Waters) для определения приблизительной молекулярной массы комплексов. Комплексы с молекулярной массой  $\geq 600$  кДа указывают на образование комплексов, состоящих из  $\geq 2$  молекул ФНО $\alpha$  и  $\geq 3$  молекул IgG. Комплексы с молекулярной массой  $\geq 300$  кДа указывают на образование комплексов, состоящих из  $\geq 2$  молекул ФНО $\alpha$  и  $\geq 3$  молекул scDb.

Пример 6. Ингибирование пролиферации клеток.

Способность различных форм антител 16-02-B03 и адалимумаба ингибировать пролиферацию монукулеарных клеток периферической крови (МКПК) исследуют в реакции смешанных лимфоцитов (РСЛ). МКПК от 2 здоровых доноров культивируют (RPMI1640) в отношении 1:1 в 96-луночных планшетах в течение 48 ч при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. После активации клетки обрабатывают антителами к ФНО $\alpha$  или контрольным антителом IgG (все в конечной концентрации 10 мкг/мл) в шести повторностях в течение еще 5 дней при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. За 24 ч до окончания инкубации в каждую лунку добавляют бромдезоксисуридин (BrdU) (20 мкл/лунку) и определяют пролиферацию путем определения включения BrdU с применением коммерчески доступного ИФА для детекции пролиферации клеток (Roche Diagnostics). Индекс стимуляции определяют путем расчета отношения включения BrdU между клетками, обработанными антителами, и клетками, обработанными митомицином C (25 нг/мл). Все исследованные формы антител 16-02-B03, как ожидается, будут значительно ингибировать пролиферацию Т-клеток в степени, сравнимой с адалимумабом.

Пример 7. Ингибирование индуцированной ЛПС секреции цитокинов.

Моноциты CD14<sup>+</sup> в RPMI1640 высевают в 96-луночные планшеты и инкубируют в течение 16 ч при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе с увлажнением. Затем клетки обрабатывают антителами к ФНО $\alpha$  или контрольным антителом IgG в двух повторностях в течение 1 ч с применением конечных концентраций антител, находящихся в диапазоне от 2 до 2000 нг/мл. Моноциты промывают три раза средой для культивирования клеток и затем инкубируют с ЛПС (100 нг/мл) в течение 4 ч при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Концентрации ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в супернатантах культуры клеток определяют с применением коммерчески доступных

наборов для ИФА (R&D Systems). IC<sub>50</sub> определяют с использованием четырехпараметрической логистической модели для подбора кривой.

Таблица 10. Консенсусные последовательности V<sub>k1</sub> (перестроенные)

	Положения по Кабату:	SEQ ID №:	Последовательность
Каркасный участок I	1-23	21	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
Каркасный участок II	35-49	22	WYQQKPGKAPKLLIY
Каркасный участок III	57-88	23	GVPSRFRSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC

Таблица 11. Последовательности основанной на последовательности V<sub>λ</sub>, зародышевой линии каркасного участка IV

SEQ ID №:	Последовательность
24	FGTGTKVTVL
25	FGGGTKLTVL
26	FGGGTQLIIL
27	FGSGTKVTVL

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его функциональный фрагмент, способное связываться с фактором некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ) человека, причем указанное антитело или функциональный фрагмент содержит (i) домен V<sub>L</sub>, содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и (ii) домен V<sub>H</sub>, содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

2. Антитело или функциональный фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что указанное антитело или функциональный фрагмент содержит (i) домен V<sub>L</sub>, содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и (ii) домен V<sub>H</sub>, содержащий участок CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, участок CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и участок CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

3. Антитело или функциональный фрагмент по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанное антитело или функциональный фрагмент

связывается с ФНО $\alpha$  человека с константой диссоциации (K<sub>D</sub>) менее 200 пМ;

обладает перекрестной реактивностью с ФНО $\alpha$  *Macaca mulatta* (макака-резуса) и ФНО $\alpha$  *Macaca fascicularis* (яванского макака);

обладает более высокой способностью подавлять индуцированный ФНО $\alpha$  апоптоз по сравнению с инфликсимабом при определении с помощью анализа с L929;

содержит переменный домен, имеющий температуру плавления, определенную с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, составляющую по меньшей мере 75°C, и/или

способно(ен) связываться с ФНО $\alpha$ <sub>тример</sub> человека в стехиометрическом отношении (антитело : ФНО $\alpha$ <sub>тример</sub>), составляющем по меньшей мере 2.

4. Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело или функциональный фрагмент содержит домен V<sub>H</sub>, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и/или домен V<sub>L</sub>, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

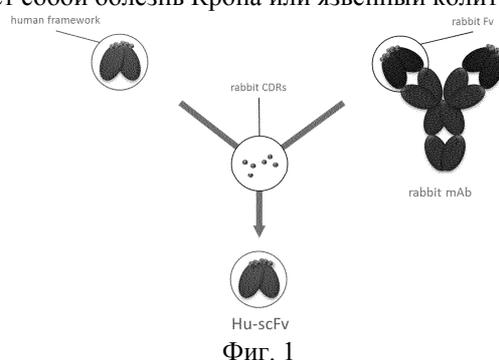
5. Антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что функциональный фрагмент представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

6. Антитело или функциональный фрагмент по п.5, отличающийся тем, что указанный scFv имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12.

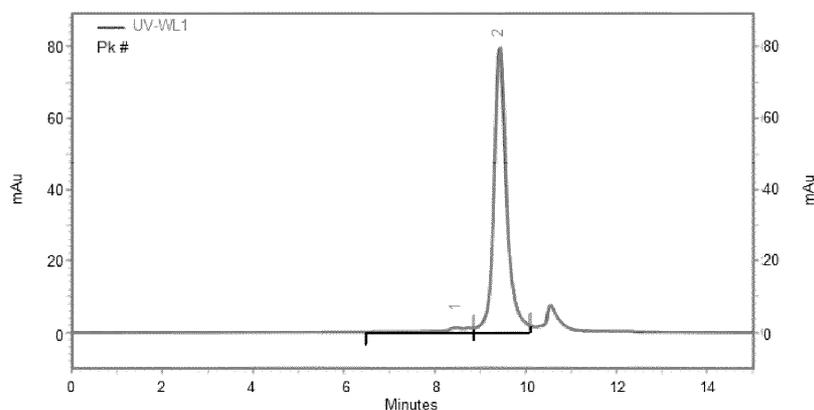
7. Антитело или функциональный фрагмент по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что антитело представляет собой иммуноглобулин G (IgG).

8. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или функциональный фрагмент по любому из предшествующих пунктов.

9. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.8.
10. Экспрессирующий вектор по п.9, отличающееся тем, что вектор является плазмидой.
11. Клетка для получения антитела или функционального фрагмента определенных в любом из пп.1-7, содержащая нуклеиновую кислоту по п.8 или экспрессирующий вектор по п.9 или 10.
12. Способ получения антитела или функционального фрагмента по любому из пп.1-7, включающий культивирование клетки по п.11 в среде при условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей указанное антитело или функциональный фрагмент, и выделение антитела или функционального фрагмента из указанных клеток или среды.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или функциональный фрагмент по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.
14. Применение антитела или функционального фрагмента по любому из пп.1-7 для лечения связанного с ФНО $\alpha$  воспалительного расстройства.
15. Применение по п.14, причем указанное воспалительное расстройство представляет собой воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта.
16. Применение по п.15, причем указанное воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта представляет собой воспалительное заболевание кишечника.
17. Применение по п.14 или 15, причем указанное воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта представляет собой болезнь Крона или язвенный колит.

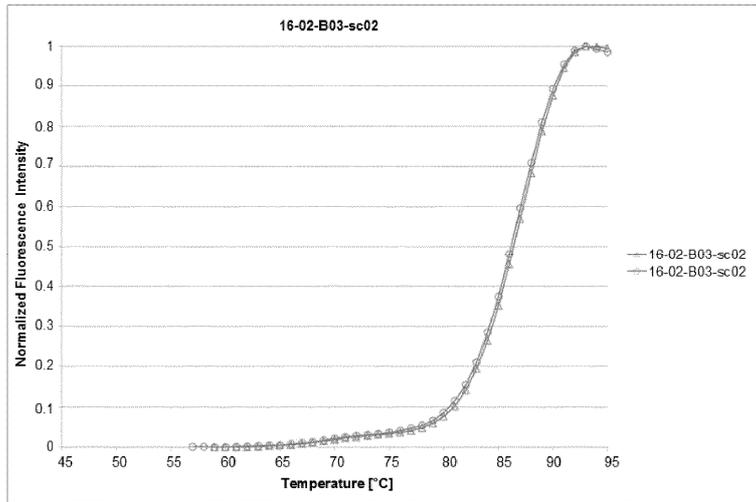


16-02-B03-sc02

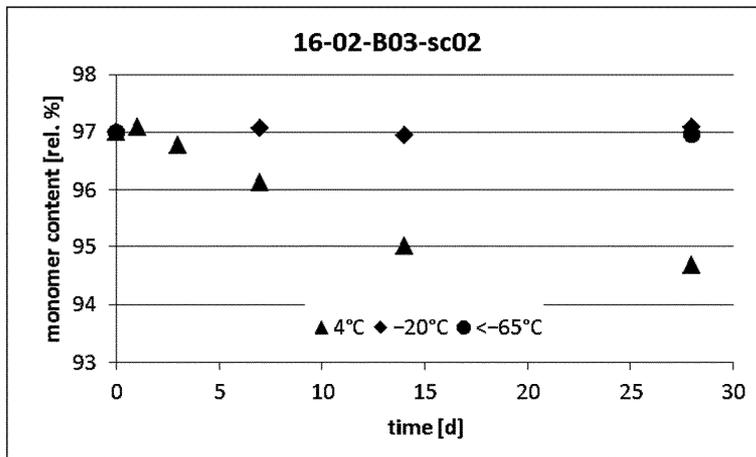


UV-WL1 Results				
Pk #	Name	Retention Time	Area Percent	Area
1	dimeric scFv	8.453	3.01	192413
2	monomeric scFv	9.413	96.99	6206022
Totals			100.00	6398435

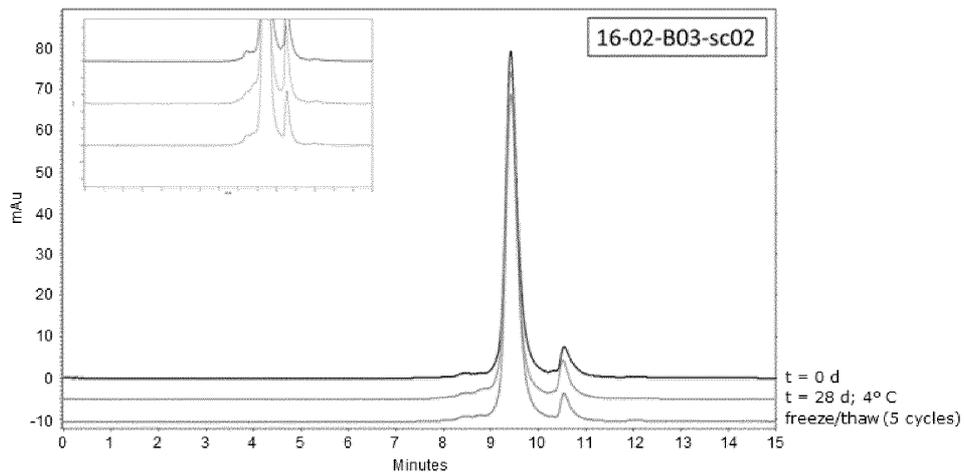
Фиг. 2



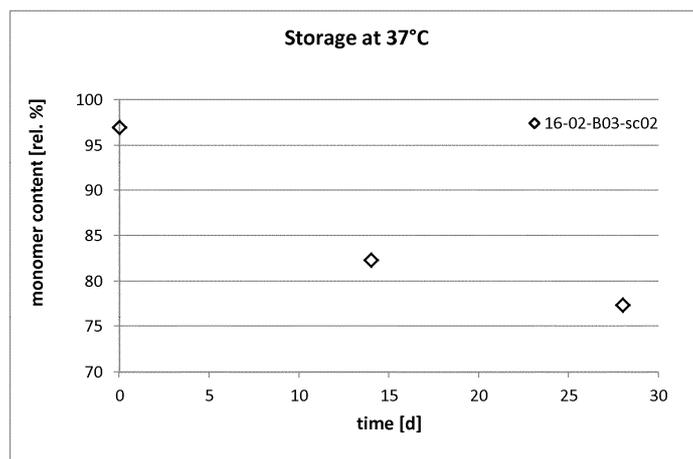
Фиг. 3



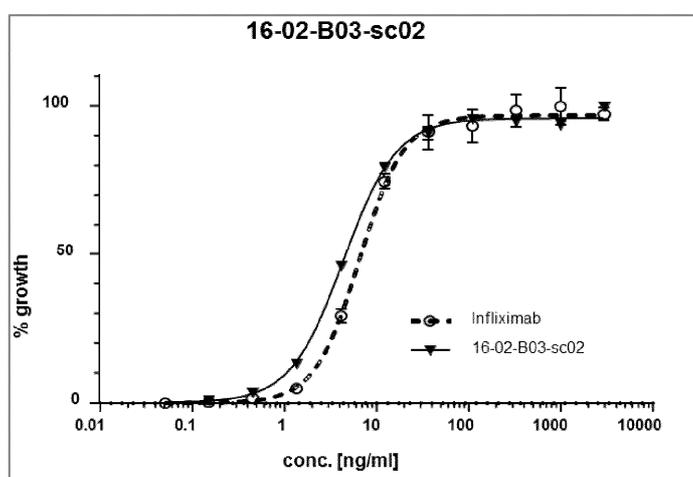
Фиг. 4



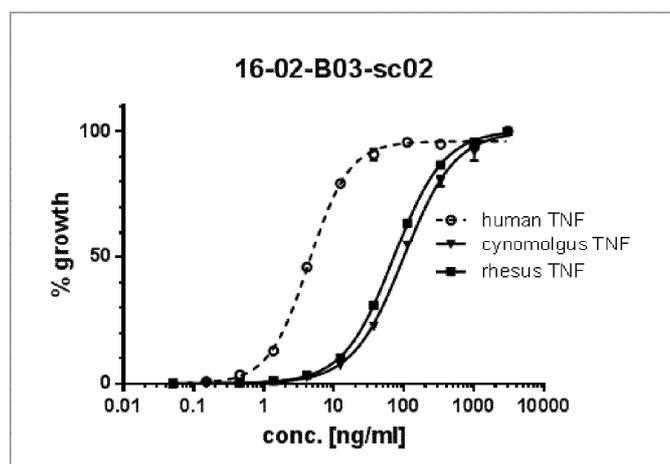
Фиг. 5



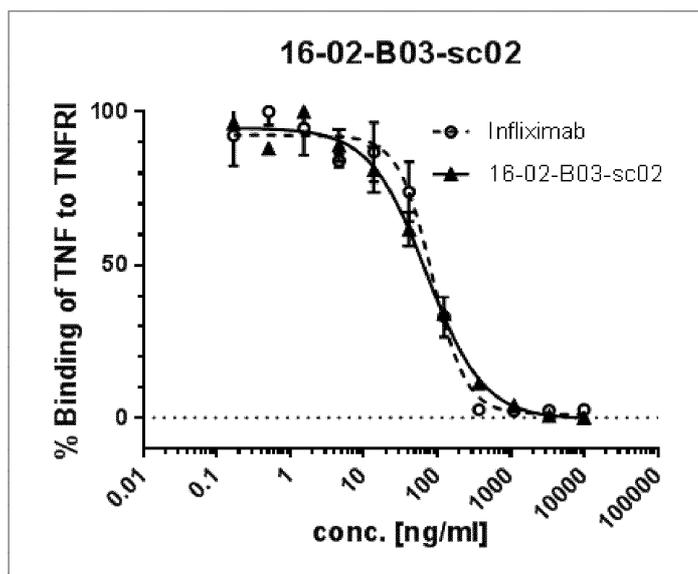
Фиг. 6



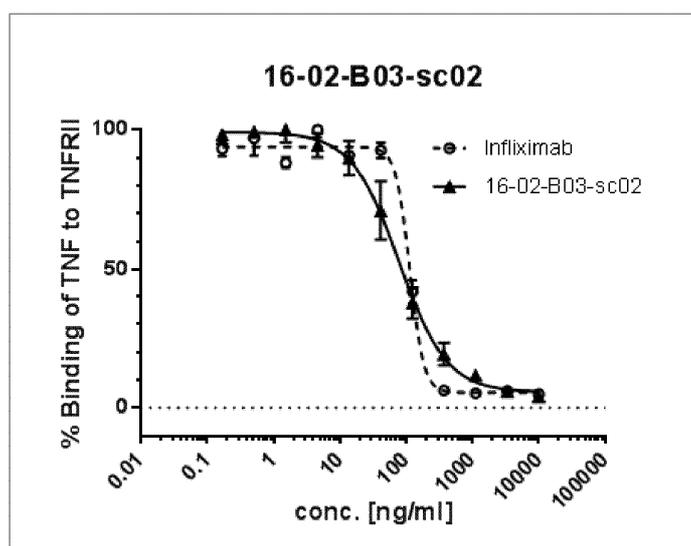
Фиг. 7



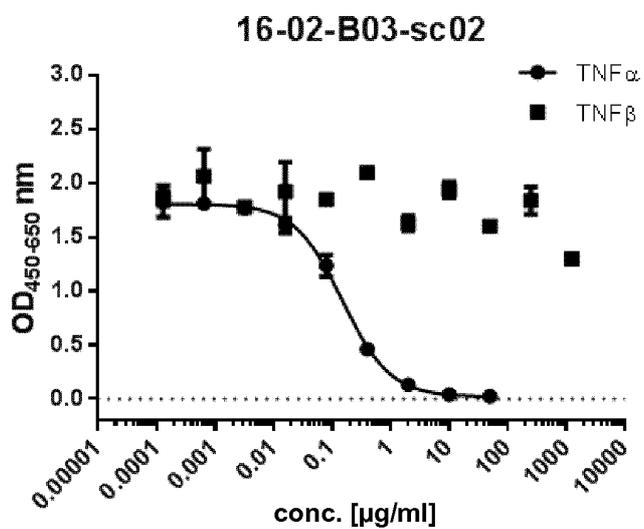
Фиг. 8



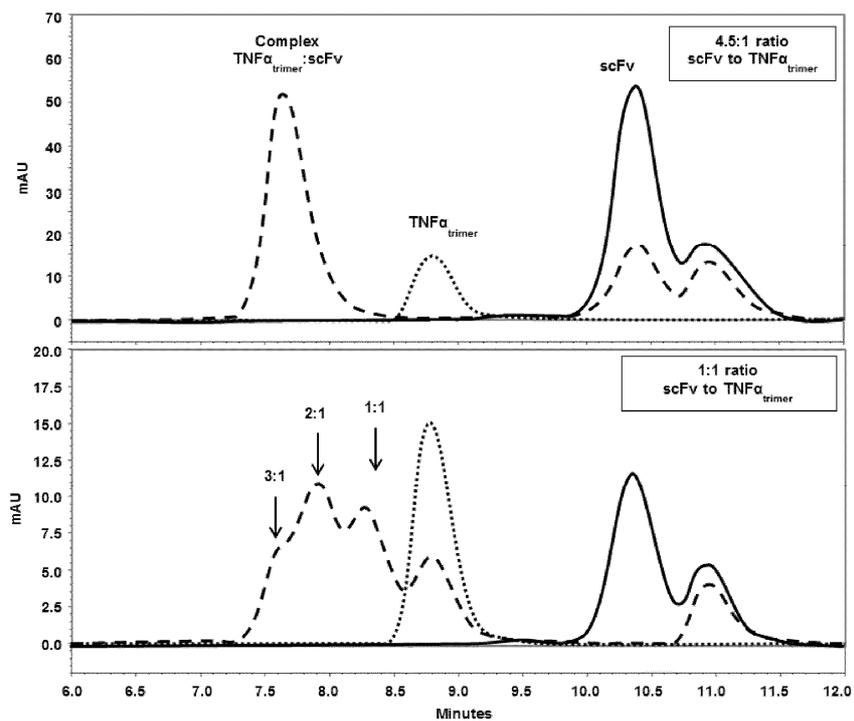
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

