# ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ФНО-А ЧЕЛОВЕКА

Солопова О.Н., Позднякова Л.П., Варламов Н.Е. , Морозкина Е.В. , Ягудин Т.А. , Беневоленский С.В. , Свешников П.Г.
*ОАО "Всероссийский научный Центр молекулярной диагностики и лечения",*
*Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН*

Болезни, характеризующиеся состоянием хронического воспаления, по встречаемости находятся на первом месте среди всех известных заболеваний, обгоняя сердечно-сосудистые патологии и рак. Больных ревматоидным артритом и остеоартритом в Европе более 5,5% от всего населения, еще примерно 2% болеют псориазом, суммарно не менее 1% всех европейских жителей страдают болезнью Крона, неспецифическим язвенным колитом, болезнью Бехтерева и другими патологиями, связанными с хроническим воспалением. Применение препаратов, блокирующих действие основного провоспалительного цитокина - фактора некроза опухоли-альфа, позволяет добиться значительного улучшения состояния больных вплоть до полного исчезновения симптомов, однако большинство больных в России такого лечения не получают из-за отсутствия доступных отечественных препаратов. Кроме того, длительное применение таких препаратов приводит к развитию резистентности к ним, что заставляет разрабатывать новые средства для нейтрализации действия ФНО-а. Этапом для разработки нового отечественного препарата - блокатора ФНО-а - стало получение мышиных антител, нейтрализующая активность которых была показана в биологических тестах по ингибированию индукции ФНО-а-опосредованного апоптоза и ингибированию ФНО-а-опосредованной индукции экспрессии молекул адгезии ICAM1, а также установление нуклеотидных последовательностей генов вариабельных доменов моноклонального антитела.

В результате серии гибридизаций было получено 23 клона антител, специфичных к ФНО-а, восемь из них обладали ингибирующей активностью, определенной в тесте по ингибированию ФНО-а-опосредованного апоптоза на клетках L929. Два антитела с выраженной ингибирующей активностью были исследованы на предмет ингибирования экспрессии ICAM-1 на поверхности эндотелиальных клеток, тест проводили в сравнении с антителом infliximab, составляющим основу препарата Remicade. Ингибирующая активность антител E2 и H3 сопоставима с активностью антитела infliximab при продолжительности инкубации 5 часов. При более длительной инкубации новые антитела уступают контрольному антителу, что, по-видимому, может быть связано с меньшей стабильностью антител субизотипов, отличающихся от IgG1. Исходное мышиное антитело - прообраз антитела infliximab - обладало меньшей активностью, чем рекомбинантное антитело, что его создатели объясняют наличием примесей неактивных гибридомных антител в образце исходного мышиного антитела. В образцах антител E2 и H3 также неизбежно присутствуют примеси неактивных антител из асцитных жидкостей, поскольку метод хроматографии на белок Ж-сефарозе не позволяет отделять неспецифичные антитела от антител против ФНО-а. Получение рекомбинантного антитела или его фрагмента эту проблему полностью решает.

Три антитела с наибольшей нейтрализующей активностью подвергли протеолитическому расщеплению папаином. Полученные Fab-фрагменты исследовали, измеряя их константы диссоциации с ФНО-а, а также их нейтрализующую активность в тесте ингибирования апоптоза на клетках L929. Наибольшую ингибирующую активность показал Fab-фрагмент антитела F11. Гены легкой и тяжелой цепей Fab фрагмента антитела F11 клонированы методом ПЦР с использованием в качестве матрицы кДНК продуцирующих клеток. Определены нуклеотидная и аминокислотная последовательности этих генов. Ген V-области лёгкой цепи принадлежит к подгруппе IGKV6 и содержит 5 мутаций (1 молчащая), две из которых расположены в антигенсвязывающих областях. Ген V-области тяжёлой цепи принадлежит к подгруппе IGHV3 и содержит 5 мутаций (2 молчащие), три из которых расположены в антигенсвязывающих областях.

Наличие нуклеотидной последовательности генов рекомбинантного Fab фрагмента и системы для его экспрессии в клетках метилотрофных дрожжей P. pastoris позволит перейти к работе по гуманизации антитела против ФНО-а человека.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 16.512.12.2012).