



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 139 092** <sup>(13)</sup> **C1**  
 (51) МПК<sup>6</sup> **A 61 K 39/395, C 07 K 16/06**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

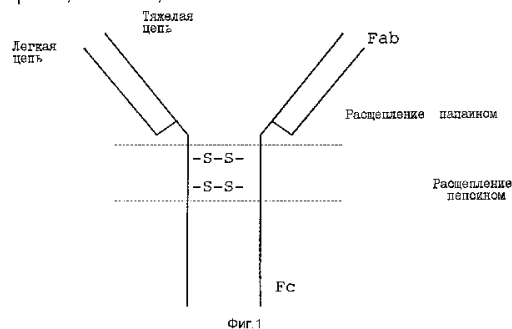
(21), (22) Заявка: 96101193/14, 03.06.1994  
 (24) Дата начала действия патента: 03.06.1994  
 (30) Приоритет: 03.06.1993 GB 9311507.9  
 10.02.1994 GB 9402593.9  
 (46) Дата публикации: 10.10.1999  
 (56) Ссылки: 1. EP 0350690 A, 17.01.90. 2. WO 8908460 A, 21.09.89. 3. Beutler B., Milsark I.W., Gerami A. Science, 1985, 229, pp.869-871.  
 (85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 03.01.96  
 (86) Заявка РСТ: GB 94/01209 (03.06.94)  
 (87) Публикация РСТ: WO 94/29347 (22.12.94)  
 (98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул.Б.Спасская 25, стр.3, ООО "Союзпатент", патентному поверенному Лебедевой Н.Г.

(71) Заявитель: Терапьютик Антибодиз Инк. (US)  
 (72) Изобретатель: Джон Ландон (GB)  
 (73) Патентообладатель: Терапьютик Антибодиз Инк. (US)

**(54) ФРАГМЕНТЫ АНТИТЕЛ В ТЕРАПИИ**

(57) Реферат:  
 Изобретение относится к области медицины, в частности к иммунологии, и может применяться для нейтрализации  $TNF\alpha$  у пациента, нуждающегося в такой нейтрализации. Пациенту вводят IgG - Fab-фрагмент, обладающий реактивностью по отношению к  $TNF\alpha$ . Указанный Fab-фрагмент происходит от поликлонального IgG. Причем пациент страдает септическим шоком или симптомами септического шока. Для нейтрализации  $TNF\alpha$  также используют фармацевтическую композицию, которая содержит IgG - Fab-фрагмент, обладающий реактивностью по отношению к  $TNF\alpha$  и физиологически приемлемый носитель, а Fab-фрагмент происходит от поликлонального

IgG. Способ и композиция обеспечивают повышение эффективности лечения симптомов септического шока. 4 с. и 5 з.п. ф-лы, 3 табл., 9 ил.



RU 2 139 092 C1

RU 2 139 092 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 139 092** <sup>(13)</sup> **C1**  
 (51) Int. Cl.<sup>6</sup> **A 61 K 39/395, C 07 K 16/06**

RUSSIAN AGENCY  
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96101193/14, 03.06.1994  
 (24) Effective date for property rights: 03.06.1994  
 (30) Priority: 03.06.1993 GB 9311507.9  
 10.02.1994 GB 9402593.9  
 (46) Date of publication: 10.10.1999  
 (85) Commencement of national phase: 03.01.96  
 (86) PCT application:  
 GB 94/01209 (03.06.94)  
 (87) PCT publication:  
 WO 94/29347 (22.12.94)  
 (98) Mail address:  
 129010, Moskva, ul.B.Spasskaja 25, str.3,  
 OOO "Sojuzpatent", patentnomu poverennomu  
 Lebedevoj N.G.

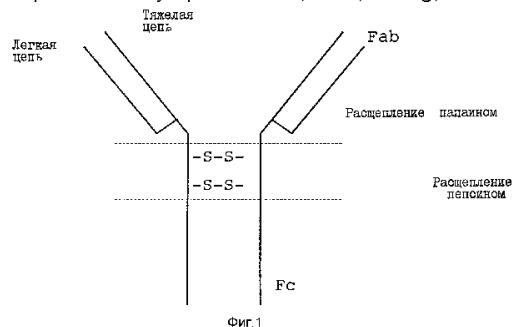
(71) Applicant:  
 Terap'jutik Antibodiz Ink. (US)  
 (72) Inventor: Dzhon Landon (GB)  
 (73) Proprietor:  
 Terap'jutik Antibodiz Ink. (US)

(54) **USE OF ANTIBODY FRAGMENT IN THERAPY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, immunology. SUBSTANCE: invention relates to an antibody fragment that can be used for neutralization of TNF- $\alpha$  in patient needing with such neutralization. Method involves the administration to patient IgG-Fab-fragment showing reaction with respect to TNF- $\alpha$ . Indicated Fab-fragment is originated from polyclonal IgG and this fragment is administrated to the patient suffering with septic shock or septic shock symptoms. For neutralization of TNF- $\alpha$  a pharmaceutical composition containing IgG-Fab-fragment that shows reaction to TNF- $\alpha$  and a physiologically acceptable carrier is used being Fab-fragment

originates from polyclonal IgG. EFFECT: enhanced effectiveness of treatment of septic shock symptoms. 9 cl, 3 tbl, 9 dwg, 7 ex



RU 2 139 092 C1

RU 2 139 092 C1

Настоящее изобретение относится к использованию Fab-фрагментов иммуноглобулина в терапии.

Антитела образуются как часть иммунного ответа организма на попадание в него микроорганизмов или чужеродных молекул. Эти антитела представляют собой иммуноглобулин (Ig) и широко используются в клинической практике для диагностики, наблюдения, и лечения все возрастающего числа заболеваний.

Основная единица, из которой образуются все молекулы антител, была обнаружена Портером (1959) *Biochem J.* 73, 119-126, с использованием протеолитических ферментов. Одним из наиболее важных классов иммуноглобулинов, а именно IgG, состоит из двух тяжелых и двух легких цепей, причем тяжелые цепи связаны в своей шарнирной области дисульфидными связями. Расщепление этих связей папаином приводит к образованию двух антиген-связывающих фрагментов (Fab), и одного кристаллизирующегося фрагмента (Fc), как показано на фиг. 1. Расщепление пепсином ниже шарнирной области приводит к образованию немного более мелкого Fc-фрагмента, и одного F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента с двумя сайтами связывания, как показано на фиг. 1. Каждый Fab-фрагмент содержит легкую цепь и часть тяжелой цепи, и включает в себя последовательности, ответственные за специфическое связывание с микроорганизмом и чужеродной макромолекулой. Fc состоит из оставшихся частей двух тяжелых цепей, и представляет собой участок, с которым могут связываться комплемент, макрофаги, и полиморфно-ядерные лейкоциты. Две тяжелые цепи (но не легкие цепи) для каждого класса антител, т. е. IgG, IgM, IgA и IgE, являются различными. Из общего количества всех иммуноглобулинов, присутствующих в кровотоке, наибольшая доля приходится на IgG. Он состоит из одной основной иммуноглобулиновой единицы, и обладает характерной для него высокой степенью сродства к своему специфическому антигену. Структура антител и их функции более подробно раскрыты Roitt (1991) *Essential Immunology*, 7th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Вредное действие микробных патогенов может быть обусловлено высвобождением растворимых токсинов. Такими токсинами являются нейрогенные экзотоксины, высвобождаемые дифтерийной и столбнячной палочками, и различные эндотоксины, такие как липополисахариды (LPS), выделяемые клеточными стенками грам-отрицательных бактерий, и пептидогликаны, выделяемые грам-положительными микроорганизмами. В 1890 году, фон Беринг показал, что экзогенные антитела к растворимым антигенам обладают терапевтическим действием, так, например, смертность детей от дифтерии снижалась благодаря системному введению сыворотки, полученной от лошади, гипериммунизированной дифтерийным токсидом. Аналогичный эффект был получен и для пациентов, страдающих столбняком. В 1894 году, Кальметт (Calmette) и др. применили пассивную иммунизацию к пациентам с

интоксикацией, вызванной укусом змей.

В развитии синдрома септического шока принимают участие инициаторы (такие, как липополисахариды, LPS), медиаторы (включая, TNF $\alpha$ , 1L-1 и 1L-6), и эффекторы на клеточном уровне (например, (окись азота)-синтаза в эндотелиальных клетках). Все инициаторы и медиаторы являются потенциальными антигенами, и антитела против этих макромолекул могут быть использованы для предупреждения и лечения септического шока. Некоторыми исследователями, с различной степенью успеха, были использованы поликлональные (PcAb) или моноклонельные (McAb) антитела, направленные против TNF $\alpha$ . В то же самое время было показано, что PcAb против TNF $\alpha$  могут предупреждать летальное действие этого цитокина (Beutler et al., (1985) *Science* 229, 869-871) у BALB/C-мышей. Tracey и его коллеги ((1987) *Nature* 330, 662-664) показали, что McAb против TNF $\alpha$ , введенные за 1 час до контрольного заражения повиванов, обеспечивают частичную защиту от поражения органов, а введение этих антител за два часа до контрольного заражения обеспечивает более полную защиту. Другими словами, моноклональные антитела (McAb) против TNF $\alpha$  были использованы профилактически. Несколько групп исследователей продуцировали, в основном, у кроликов поликлональные антитела (PcAb) к LPS и к TNF, и продемонстрировали их эффективность против септического шока на моделях животных. Кроме того, PcAb к LPS также индуцировались у добровольцев, а затем успешно использовались (Ziegler et al., 1982) *New Engl. J. Med.* 307, 1225-1230). Хотя использование человеческих антител позволяет избежать риска возникновения аллергических реакций, однако такое использование не получило широкого распространения из-за этических, материально-технических, и других соображений, включая риск возможного заражения вирусной инфекцией (ВИЧ и гепатит). Поэтому большинство исследователей сконцентрировало свои усилия на продуцирование McAb. McAb имеют много преимуществ, в числе которых являются, например, их гомогенность и относительная простота их окончательной обработки, в основном, с помощью аффинной хроматографии с использованием белка A или белка G для отделения антител от других белков.

Однако никто из исследователей, участвующих в разработке способов лечения септического шока, не получил и не использовал специфические Fab-фрагменты. Кроме того, никто из исследователей не продемонстрировал использование Fab-фрагментов против TNF для лечения людей, страдающих септическим шоком с явно выраженными клиническими симптомами, характерными для этого заболевания.

Краткое описание изобретения

Авторами настоящей заявки было продемонстрировано, что введение Fab-фрагмента, обладающего реактивностью против TNF $\alpha$ , оказывает положительное воздействие на пациентов, страдающих симптомами "септический шок".

Кроме того, авторами настоящей заявки было неожиданно обнаружено, что Fab-фрагменты, происходящие от поликлональных антител, направленных против TNF $\alpha$ , являются более эффективными для снижения действия TNF $\alpha$ , чем интактный иммуноглобулин IgG против TNF $\alpha$ , как подробно описано в примерах.

Таким образом, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу нейтрализации действия TNF $\alpha$  у пациентов, нуждающихся в такой нейтрализации, который предусматривает введение этому пациенту Fab-фрагмента, являющегося реакционноспособным по отношению к TNF $\alpha$ .

Указанные пациенты обычно страдают от септического шока или от симптомов септического шока. Таким образом, в другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу предупреждения или ослабления септического шока или его симптомов у пациента, предусматривающему введение пациенту IgG-Fab-фрагментов, являющихся реакционноспособными по отношению к TNF $\alpha$ .

Fab-фрагменты могут быть генерированы, в основном, из чистого IgG, реактивного по отношению к TNF $\alpha$ , хорошо известными методами, описанными в примерах.

В следующем своем аспекте, настоящее изобретение относится к IgG-Fab-фрагментам, являющимся реактивными по отношению к TNF $\alpha$ , и предназначенными для использования в медицине.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к использованию IgG-Fab-фрагмента, обладающего реактивностью против TNF $\alpha$ , в изготовлении лекарственных средств для лечения пациентов, нуждающихся в нейтрализации действия TNF $\alpha$  в их организме.

Кроме того, предпочтительно, чтоб IgG-Fab-фрагменты происходили от поликлональной антисыворотки.

Поликлональная антисыворотка (которая является поликлональным IgG) может быть продуцирована путем иммунизации овец, коз, лошадей, или других млекопитающих. Предпочтительным млекопитающим является овца, и животные, не подверженные заражению вирусом скрепи и зоонозным вирусом. Методы получения Fab-фрагментов, обладающих реактивностью против TNF $\alpha$ , и происходящих от поликлональных овечьих иммуноглобулинов IgG, описаны в примерах.

Fab-фрагменты, обладающие реактивностью против TNF $\alpha$ , могут быть использованы для лечения состояний человека, характеризующихся повышенными уровнями TNF $\alpha$  в крови. Такими состояниями являются шок, например, септический шок, а также избыточное присутствие TNF $\alpha$  в кровотоке при опухолевой терапии. Септический шок может возникать в результате бактериальной инфекции, а, в частности, инфекции, вызываемой грам-отрицательными бактериями, а также в результате септицемии. Шок может также вызывать травма в результате несчастного случая или хирургической операции. Кроме того, указанные Fab-фрагменты могут быть использованы при антиопухолевой терапии в сочетании с антителами против лимфоцитов,

как показано в WO 89/08460, а также в сочетании с противораковой химиотерапией, как описано в EP 355067.

Известно, что внутривенные вливания козьих или лошадиных поликлональных антител, направленных против лимфоцитов человека, являются очень эффективными при лечении острой реакции отторжения почечного аллотрансплантата. Эти продукты уже применяются на практике. После клинических испытаний Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов, и косметических средств США (FDA) была выдана лицензия (в 1986 г.) фирме Ortho Pharmaceutical Co на практическое использование мышиноного моноклонального антитела ОКТЗ для предупреждения отторжения трансплантата после трансплантации почки. Этот продукт показал исключительно высокую эффективность при лечении острых реакций отторжения после трансплантации почек, печени, и сердца, причем ОКТЗ остается пока единственным терапевтическим продуктом на основе моноклонального антитела, на который была выдана лицензия.

ОКТЗ специфически связывается с комплексом CD-3, обнаруживаемом на поверхности всех зрелых Т-лимфоцитов. CD-3, в основном, участвует в распознавании антигена и стимуляции клетки, и помешать этому может пространственное затруднение, обусловленное присутствием мышинных антител.

Гибридома, продуцирующая моноклональное антитело ОКТЗ, может быть получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC) 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, под входящим номером ATCC CP2 8001. Это антитело представляет собой изотип IgG2, и является реактивным по отношению к субпопуляции хелперных Т-клеток человека. Указанные гибридома и антитело описаны в патенте США 4381295, который вводит в настоящее описание посредством ссылки. Схема лечения с использованием ОКТЗ описана в Ortho Study Group (1985) J. Engl. J. Med. 313, 337-342, которая вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Однако за неоспоримые положительные результаты, которые дает указанная терапия, направленная против Т-лимфоцитов, пациентам приходится "платить" ценою возникновения различных побочных эффектов. Так, например, во время первого вливания поликлонального глобулина против лимфоцитов, и после первой инъекции ОКТЗ, практически у каждого пациента обнаруживаются серьезные нарушения и симптомы. Такими нарушениями по крайней мере у 90% пациентов являются головные боли, тошнота, рвота, понос, общее недомогание, чрезмерная усталость, одышка, миалгия, и тахикардия. У некоторых пациентов развивается острый отек легких. Во втором периоде терапии, побочные эффекты становятся минимальным, а во всех последующих периодах и вовсе отсутствуют.

Эти клинические симптомы аналогичны симптомам, возникающим после вливания TNF или при септическом шоке. Было показано, что вливание глобулина, направленного против лимфоцитов, приводит к заметному увеличению TNF в крови от

необнаружимых уровней до уровней порядка 111 - 731 нг/л, при этом заметного повышения уровней интерлейкина  $-1\beta(1L-1\beta)$  не наблюдается. Указанное увеличение уровней TNF почти сразу сопровождается

повышением температуры (от 38,4 до 40,4°C). Целью настоящего изобретения является уменьшение шокоподобных симптомов, возникающих после введения ОКТЗ или глобулина против лимфоцитов.

В соответствии с этим, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения, Ig-Fab-фрагменты, обладающие реактивностью против TNF $\alpha$ , используют для лечения пациентов, которым вводят моноклональное антитело ОКТЗ или функционально эквивалентную поликлональную антисыворотку, например, для ослабления острой реакции отторжения при трансплантации почки. Введение 1gG или Fab-фрагментов, обладающих активностью против TNF $\alpha$ , способствует снижению шокоподобных побочных эффектов, возникающих при введении ОКТЗ или функционально эквивалентных антител.

В течение этого столетия, страны Европы, Африки и Среднего востока были охвачены массивной пандемией эпидемического возвратного тифа (спирохетоза) (LBPF), вызываемого спирохетой *Borrelia recurrentis*, однако в настоящее время, эти эпидемии ограничиваются лишь горными районами Эфиопии. Во время эпидемий, смертность людей, не получающих лечения, может превышать 40%, тогда, как смертность людей, принимающих противомикробные средства, включая пенициллин, тетрациклин, хлорамфеникол, и эритромицин, снижается до менее чем 5%. Клиническое выздоровление может быть достигнуто лишь с использованием антибиотиков, которые индуцируют сильную, а иногда летальную реакцию Джарича-Херксхейме а (JHP). Внутривенное введение тетрациклина вызывает реакцию, которая начинается примерно в течение 1 часа, после введения антибиотика, и включает в себя три фазы: озноб, жар и снижение температуры, т.е. представляет собой классическую "эндотоксинную" или "шоковую" реакцию (Wartell et al. (1970) Clin. Sci. 39, 123-145). Течение реакции может привести к летальному исходу для пациента, либо в результате гиперпирексии с максимальной температурой тела на начальной стадии фазы повышения температуры, либо в результате шока или острой сердечной недостаточности во время фазы повышения температуры/снижения температуры. Negussie и его коллеги ((1992) J. Exp. Med. 175, 1203-1207) продемонстрировали эксплозивное высвобождение TNFL с последующим высвобождением 1L-6 и 1L-8 в процессе реакции JHP.

В соответствии с этим, в другом варианте осуществления изобретения, Fab-фрагменты IgG, являющиеся реакционноспособными по отношению к TNFL, используют для лечения пациентов с симптомами септического шока, проявляющимися в виде реакции Джарича-Херксхеймера.

Обычно JHP ассоциируется с лечением эпидемического возвратного тифа антибиотиками.

Хорошо известно, что JHP, или

аналогичные реакции ассоциируются с лечением антибиотиками различных других заболеваний, вызываемых организмами-паразитами и инвазивными микроорганизмами, включая такие заболевания, как сифилис, эпидемический возвратный тиф, язвенно-пленчатая ангина, лихорадка от укуса крыс, лептоспироз, тропическая фрамбезия, бруцеллез, и африканский трипаносомоз.

При этом, следует отметить, что лечение симптомов, ассоциированных с лечением LBPF антибиотиками, с применением Fab против TNF, как описано в примерах, может быть также проведено в целях лечения JHP или аналогичных реакций, ассоциированных с лечением антибиотиками вышеупомянутых заболеваний.

Кроме того, следует отметить, что JHP эпидемического возвратного тифа дает этическую модель для клинических испытаний терапевтического воздействия, направленного против TNF $\alpha$ , а также хорошо известно, что при JHP наблюдается повышение уровней TNF $\alpha$ .

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей IgG-Fab-фрагменты, являющиеся реактивными по отношению к TNF $\alpha$ , и физиологически приемлемый носитель.

В общих чертах, IgG-Fab-фрагменты могут быть использованы всякий раз, когда возникает необходимость в нейтрализации TNF $\alpha$  у пациентов. Водимую дозу определяют в зависимости от веса пациента и тяжести состояния, но, в основном, специфический Fab-фрагмент против TNF $\alpha$  может быть введен взрослым пациентам в количестве 200-2000 мг в течение 2-3 дней.

В основном, если Fab-фрагмент производит от поликлональной антисыворотки и не является аффинно-очищенным, то может быть введено 120 мг/кг суммарного Fab, который содержит 20 мг/кг специфического Fab против TNF $\alpha$ .

Предпочтительно, чтобы Fab-фрагмент был, в основном, чистым и апиrogenным. Fab-фрагмент может быть, в основном, очищен с использованием хроматографической техники, такой как катионообменная хроматография, или аффинная хроматография. Предпочтительно, если Fab-фрагмент является аффинно очищенным.

IgG-Fab-фрагменты настоящего изобретения или их композиции могут быть введены любым стандартным системным методом, включая парентеральную (например, внутривенную, подкожную, или внутримышечную) инъекцию. Лечение может предусматривать введение разовой дозы или нескольких разделенных доз в течение определенного периода времени.

Хотя IgG-Fab-фрагмент настоящего изобретения может быть введен отдельно, однако, предпочтительно, чтобы этот фрагмент присутствовал в фармацевтической композиции в сочетании с одним или несколькими приемлемыми носителями. Носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместимым с Fab-фрагментом, и не оказывать неблагоприятного воздействия на реципиента.

Композиции, содержащие IgG-Fab-фрагменты, могут быть изготовлены в виде унифицированной лекарственной формы с использованием любых методов, которые обычно используются в фармацевтической практике. Такие методы включают в себя стадии смешивания IgG-Fab-фрагмента с носителем, состоящим из одного или нескольких вспомогательных ингредиентов. В основном, указанные композиции получают путем равномерного и тщательного размешивания активного ингредиента с жидкими носителями.

Композиции, предназначенные для патентерального введения, изготавливают в виде водных или безводных стерильных растворов для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, и растворенные вещества для придания композиции изотоничности с кровью реципиента, и в виде водных и безводных стерильных суспензий, которые могут содержать суспендирующие агенты и загустители. Эти композиции могут быть изготовлены в упаковках, рассчитанных на один прием, или в упаковках для многократного приема, например, в виде герметичных ампул и флаконов, и кроме того, они могут храниться в лиофилизированном состоянии, которое требует лишь добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, перед их непосредственным использованием. Таким образом могут быть приготовлены инъекционные растворы для немедленного приема. Предпочтительными унифицированными лекарственными композициями являются композиции, содержащие суточную дозу или единицу, дневную субдозу или ее соответствующую фракцию, активного ингредиента.

Ниже приводится описание настоящего изобретения, проиллюстрированное соответствующими примерами и чертежами, где:

На фиг. 1 схематически представлена структура молекулы антитела.

На фиг. 2 показано воздействие антитела против TNF $\alpha$  на давление в легочной артерии и лимфоток у овцы.

На фиг. 3 показано воздействие Fab-фрагментов против TNF $\alpha$  на липополисахарид-индуцированную смертность у мышей.

На фиг. 4 показано влияние конкурентного введения IgG или Fab-фрагментов против TNF $\alpha$  и TNF $\alpha$  на клетки L929.

На фиг. 5 показан эффект введения IgG или Fab-фрагментов против TNF $\alpha$  через два часа после TNF $\alpha$ -обработки.

На фиг. 6. показан эффект введения IgG или Fab-фрагментов против TNF $\alpha$  через 4 часа после TNF $\alpha$ -обработки.

На фиг. 7 показано влияние Fab-фрагмента против TNF $\alpha$ , или физиологического раствора на температуру пациентов, которые имели до начала эксперимента нормальную температуру.

На фиг. 8 показано влияние Fab-фрагмента против TNF $\alpha$ , или физиологического раствора на температуру пациентов, которые имели до начала эксперимента повышенную температуру.

На фиг. 9 показаны максимальные уровни

TNF $\alpha$  у пациентов, которым были введены физиологический раствор, контрольный Fab-фрагмент, или Fab-фрагмент против TNF $\alpha$ .

5 Пример 1. Получение TNF $\alpha$ -иммуногена для иммунизации овец

Процедура

Получение сосудов, содержащих активный TNF $\alpha$ -иммуноген

10 Сосуды должны быть новыми, не должны содержать пыли, и должны быть обработаны сиалинирующей жидкостью за 48 часов до эксперимента в целях предупреждения адгезии иммуногена к стенкам сосудов. Сиалинирующий раствор необходимо

15 заменять свежим раствором каждые 24 часа. Сиалинирование осуществляют следующим образом:

а) Сосуды ставят на металлический поднос в вытяжной шкаф

20 б) Сиалинирующий раствор приготавливают в соответствии с инструкциями производителей. Затем раствор разводят до получения 0,1%-ного раствора. При этом 0,2%-ный раствор получают при использовании 99 частей воды на 1 часть AQUASIL (Торговая марка). Раствор

25 постоянно размешивают. Сосуды должны быть наполнены раствором до краев. После этого проводят осушку воздухом по крайней мере в течение 24 часов.

После хранения при 4 °C, TNF $\alpha$  удаляют,

30 а раствор оставляют для уравнивания при комнатной температуре в течение по крайней мере 30 минут.

35 Полное количество TNF $\alpha$  для разовой ежемесячной иммунизации все группы овец отвешивают в стерильной 150-миллиметровой колбе Sterilin (торговая марка) с использованием весов. Необходимые расчеты проводят как описано ниже в главе "Вычисления, необходимые для получения иммуногена". В этих расчетах, количество иммуногена обозначается E. Любой избыток полученного иммуногена может быть сохранен, а затем использован в последующих экспериментах.

40 Затем иммуноген растворяют в 0,9%-ном физиологическом растворе. После этого раствор размешивают при непрерывном вращении в течение по крайней мере 30 минут. Количество используемого физиологического раствора обозначали F (см. ниже).

45 Аликвоты полученного раствора иммуногена распределяли по сосудам с использованием стерильных пипеток и устройства Pipetteman (торговая марка).

50 Вычисления, проводимые при получении иммуногена

55 Каждый сосуд должен содержать количество иммуногена, достаточное для иммунизации 3 овец. Затем это полное количество иммуногена (A) делят на три и округляют до следующего значения целого числа.

60  $A/3 = B$ , например,  $49/3 = 16,33$ , а после округления 17

Следовательно, количество отвешиваемого TNF $\alpha$  составляет  $3B$ , умноженное на количество иммуногена, требуемое для одной овцы (C).

$(3 \cdot B)C = D$ , например, если иммунизирующая доза для одной овцы

составляет 80 мкг, то  $(3 \cdot 17)80 = 4080$  мкг = 4,08 мг

Причем при взвешивании иммуногена необходимо учитывать содержание соли, которое может варьироваться от партии к партии.

$(D/3 \text{ TNF}\alpha \text{ в используемом материале})100 = E$

например, если используемый материал содержит 95% соли и соответственно 5%  $\text{TNF}\alpha$ , то  $(4,08/5)100 = 81,6$  мг

Затем отвешенный иммуноген растворяют в соответствующем количестве 0,9%-ного физиологического раствора, которое вычисляют путем умножения количества используемых сосудов на 4. Каждый сосуд должен содержать 4 мл физиологического раствора.

$V \cdot 4 = F$ , например,  $17 \cdot 4 = 68$  мл

Пример 2. Схема иммунизации, взятия образцов и крови для получения овец, иммунизированных против  $\text{TNF}\alpha$

В нижеприведенной Таблице I дана схема введения (в течение года, каждые две недели) иммунизирующей дозы, взятия крови, и обработки отдельных образцов или всех образцов для получения овец, иммунизированных против  $\text{TNF}\alpha$ .

Образцы брали от каждого животного до первичной иммунизации.

Этот уровень определял фоновый уровень для каждой овцы.

При этом были использованы следующие обозначения:

1: первичная иммунизация

R#: номер повторной иммунизации, проводимой после первичной иммунизации

Образец: 5-10 мл пробы крови, взятой от каждого животного для определения титра

Кровь: 10 мл взятой крови на 1 кг веса тела

IS: Отдельный образец для оценки продуктивности отдельного животного

P: Сбор крови от всех животных

Пример 3. Получение Fab-фрагментов против  $\text{TNF}\alpha$  из частично очищенных IgG

Овец иммунизировали в соответствии с вышеприведенной схемой иммунизации определенными количествами  $\text{TNF}\alpha$ , выбранными исходя из проведенных исследований реакции "доза-ответ", как описано в примерах 1 и 2. После получения адекватных уровней специфических антител в крови (по крайней мере 3 г/л), у овец, в условиях стерильности, брали кровь, которую собирали в стерильные и апиrogenные стеклянные флаконы, свертывание крови ускоряли путем использования роллер-флаконов; эти флаконы центрифугировали, после чего путем аспирации в ламинарном боксе собирали сыворотку, эту сыворотку подвергали 0,2 мкм-фильтрации и оставляли на хранение при  $-20^\circ\text{C}$ . Для предупреждения бактериального и пирогенного загрязнения, продукт был подвергнут тщательному анализу.

От различных животных собирали антисыворотки, и их иммуноглобулины осаждали при  $25^\circ\text{C}$  сульфатом натрия в целях их отделения от многих других сывороточных белков, включая альбумин. Иммуноглобулины, которые представляют, в основном, антитела класса IgG, промывали стерильным сульфатом натрия, и

ресуспендировали в физиологическом растворе.

Гидролиз папаином: Следующая стадия представляет собой расщепление антител на Fab и Fc-фрагменты с использованием папаина, активированного цистеином и EDTA. Эту стадию осуществляют в условиях, обеспечивающих полную деградацию интактного IgG. Кристаллизующийся фрагмент Fc удаляли путем центрифугирования. Супернатант после гидролиза папаином и центрифугирования содержит: (1) специфический Fab-фрагмент, направленный против нужного растворимого антигена, (2) неспецифический Fab-фрагмент, направленный против различных других эпитопов, и не представляющий интереса для рассматриваемой терапии, (3) небольшие количества белка (включая альбумин) и другие примеси, и (4) неактивированный папаин.

Аффинная хроматография

Аффинная очистка. Аффинную очистку Fab-фрагмента, направленного против фактора некроза опухоли человека (TNF), осуществляли с использованием среды, содержащей шитую агарозу (Sephacrose), с которой был связан  $\text{rTNF}\alpha$  (рекомбинантный человеческий  $\text{TNF}\alpha$ ). Для связывания  $\text{rTNF}\alpha$  со средой использовали изомочевинную связь.

Изготовление матриц для аффинной хроматографии на колонке с агарозой  $\text{rTNF}\alpha$

Материалы

Сефароза 4B, активированная бромцианом (Pharmacia, Uppsala Швеция)  
 $\text{rTNF}\alpha$  (R/D Systems Minneapolis, USA)  
Корпус для афинных колонок BPG (Pharmacia)

Большая воронка из спеченного стекла

Колба Бюхнера

Вакуумный насос

Стекланный стержень

Колба Налгена (Nalgen)

Буферы и растворы:

Все буферы должны быть стерильными и апиrogenными (см. SOP 0,2, получение стерильных апиrogenных буферов для терапевтического применения).

Соляная кислота (1 мМ, 200 мг/г, охлажденная льдом)

Бикарбонат натрия (0,1 М, pH 8,3), содержащий хлорид натрия (0,5 М)

Этанолламин (1,0 М, pH 8,0)

Ацетат натрия (0,1 М, pH 4,0), содержащий хлорид натрия (0,5 М)

Процедура: При подготовке колонок, предназначенных для терапевтических целей, все процедуры должны проводиться в ламинарном потоке в условиях класса 100, а все оборудование должно быть стерильным и апиrogenным.

Набухание и промывка геля: необходимое количество лиофилизированного порошка Сефарозы отвешивали в пластиковый флакон Налгена, и суспендировали в HCl (охлажденном льдом). Затем набухший сразу после этого гель промывали в течение 15 минут на фильтре из спеченного стекла тем же самым раствором (200 мл/г геля). Раствор добавляли в нескольких аликвотах, и после добавления последней аликвоты, гель осушали до тех пор, пока на его поверхности не появлялись трещины.

Связывание лиганда: TNF лиганд (5 мг/г

используемого геля) растворяли в натрийбикарбонатном буфере (0,1 М, pH 8,3, 7 мг/г используемого геля) в пластиковых флаконах Налгена. После растворения брали аликвоты (0,25% от полного количества), и добавляли осушенный воздухом гель, при этом необходимо следить за тем, чтобы лигандный раствор не выплескивался из флакона. Затем полученную смесь подвергали непрерывному вращению в течение ночи при 4°C.

Блокирование активных групп на геле: после процедуры связывания, проводимой в течение ночи, гель переносили обратно на воронку из спеченного стекла, лигандный раствор отсасывали и собирали. Затем гель промывали 200 миллилитрами этаноламина. Все промывки собирали.

После этого гель переносили во флаконы Налгена, содержащего этаноламин (1,0 М, pH 8,0), и смесь вращали в течение ночи, как описано выше.

Промывка геля: заблокированный гель переносили на воронку из спеченного стекла, после чего этаноламиновый раствор отсасывали и собирали. Затем гель промывали буфером для связывания (бикарбонатом), после этого ацетатным буфером, а затем снова буфером для связывания. Все промывки собирали.

Затем гель может быть перенесен и упакован внутри колонки, после чего он моет быть тщательно промыт физиологическим раствором (0,9%).

Эффективность связывания определяли путем измерения количества белка в промывках с последующим сравнением этого количества с аликвотой исходного лигандного раствора.

После получения каждой партии материала и до первого добавления раствора полного Fab-гидролизата, колонки подвергали санитарной обработке.

Fab-раствор вращали со скоростью потока 1 мл/мин в течение по крайней мере двух часов при 18°C.

Затем проводили десорбцию Fab против rTNF $\alpha$ -токсина от носителя.

Fab-фрагмент против овечьего rTNF $\alpha$ , связанный с носителем, удаляли путем промывания колонки глицином (10 мМ, pH 2,5). Элюент собирали в цитратный буфер (0,6 М, pH 8,0: 2,5%-ная конечная концентрация), и оставляли на хранение в 2-литровых сборниках Налгена для одноразового использования. Затем брали образцы для QC-испытаний (GF-FPLC, pH, концентрация белка, стерильность, и LAL-тест) (QC - тест на качество, GF-гель-фильтрация, LAL-тест = лимулюс-тест: проба с лизатом амебоцитов -Прим. пер.)

Аффинные колонки уравнивали с использованием фосфатного буфера (10 мМ, pH 7,3) до тех пор, пока pH элюента не становился равным приблизительно pH 5,5. Затем колонку уравнивали физиологическим раствором (0,9%) для подготовки следующего цикла.

Дополнительно или альтернативно может быть также использована катионообменная хроматография.

Катионообменная хроматография

Полный Fab-раствор (в аммонийацетатном буфере) наносили на катионообменную

колонку (BioRad MacroPrepS, в настоящий момент, хотя, в будущем, она может быть заменена на колонку с более слабым связыванием), где связывается большая часть (> 80%) Fab. Затем эту колонку, а следовательно, и связанные Fab промывали буфером (аммонийацетатным, pH 4,0) в объеме, составляющим три объема колонки, в целях санации продукта и удаления возможного загрязнения прионом или вирусами.

После этой промывки, связанные полные Fab, элюировали путем промывания колонки буфером, содержащим хлорид натрия (0,5 М). Затем элюированные Fab подвергали ультрафильтрации, и промывали физиологическим раствором для удаления аммонийацетатного буфера, после чего, если это требовалось, концентрировали, и подавали насосом в стерильный полиэтиленовый мешок для переноса образцов. Этот мешок был непосредственно прикреплен к разливочной машине. Затем продукт окончательно фильтровали, разливали, окончательно расфасовывали, и лиофилизовали.

Ионообменную колонку подвергали санитарной обработке между циклами с использованием гидроксида натрия (1,0 М), а затем снова уравнивали аммонийацетатным буфером, после чего колонка была готова для проведения следующего цикла.

Пример 4. Биологическое действие IgG против овечьих TNF $\alpha$ .

Результаты исследований, проведенных с использованием интактных и очищенных не аффинным способом антител, а также овечьей модели септического шока, показаны на фиг. 2. Эти антитела частично предупреждают повышение давления в легочной артерии и повышение лимфотока в легких, которое наблюдается в контрольной группе, не обработанной иммуноглобулинами IgG против TNF $\alpha$ .

Пример 5. Биологическое действие Fab-фрагментов против овечьих TNF $\alpha$  у мышей

Результаты исследований, проведенных с использованием специфических Fab-фрагментов против овечьих TNF $\alpha$  инъецированных мышам с летальной дозой эндотоксина, показаны на фиг. 3. 90% мышей, которым вводили эндотоксин, погибали на 4-й день. При введении мышам специфических Fab-фрагментов в концентрации 2 мг/кг и 20 мг/кг, этот процент снижался до 80% и 30%, соответственно.

Пример 6. Сравнение защитного действия анти TNF $\alpha$ -IgG и анти TNF $\alpha$ -Fab-фрагментов, направленного против цитотоксичного действия TNF

Авторами настоящей заявки было проведено исследование защитного действия анти- TNF $\alpha$ -IgG и анти-TNF $\alpha$  Fab-фрагментов, направленного против цитотоксичности TNF $\alpha$ , на клетках L929. При культивировании указанных выделенных клеток *in vitro*, добавление 10 нг/мл TNF $\alpha$  к культуральной среде приводило к лизису клеток (о чем свидетельствовало снижение оптической плотности, как показано на фиг. 4). Одновременное добавление 100 мкг/мл



IgG или Fab оказывало значительное защитное действие на клетки путем связывания антител с TNF и его нейтрализации, при этом защитное действие IgG лишь незначительно превышало защитное действие Fab.

На фиг. 5, а особенно на фиг. 6 показаны совершенно неожиданные результаты. При добавлении антител через 2 или 4 часа после добавления TNF, защитное действие Fab-фрагментов значительно превышало защитное действие интактного IgG. Таким образом, совершенно очевидно, что усиление защитного действия обусловлено задержкой в добавлении специфических Fab-фрагментов.

На основании этих данных можно сделать вывод, что Fab-фрагменты могут быть также использованы *in vivo* (т.е., введены пациенту) через 2 или 4 часа после увеличения уровней TNF во время септического шока.

Пример 7. Клинические испытания использования анти TNF  $\alpha$ -Fab-фрагментов для предупреждения или ослабления реакции Джарича-Херксхеймера (JHP) после противомикробного лечения эпидемического возвратного тифа

После пандемии, охватившей страны Африки, Среднего востока и Европы в начале века, Эфиопия остается единственным регионом, где до сих пор имеют место вспышки эпидемий эпидемического возвратного тифа (LBRF). При некоторых эпидемиях, смертность людей, не получавших лечения, превышала 50%, однако, хотя противомикробное лечение является эффективным против спирохетоза, вызываемого *Borrelia recurrentis* и способствует предупреждению рецидивов заболевания, оно, тем не менее, ассоциируется с опасной для жизни реакцией Джарича-Херксхеймера (JHP), которая по своему проявлению напоминает классическую эндотоксинувую лихорадку. JHP связана с эксплозивным выбросом фактора некроза опухоли (TNF), 1L-6 и 1L-8. Было проведено испытание рандомизированным двойным слепым методом нового овечьего поликлонального Fab-антитела против TNF, которое было осуществлено в Аддис-Абебе с участием 49 пациентов, страдающих LBRF. За 30 минут до введения пенициллина, пациентам делали внутривенные вливания либо специфического анти-TNF-Fab (20 пациентам), либо контрольных Fab (19 пациентам), либо изотонического физиологического раствора (10 пациентам). JHP-реакции (которые клинически проявлялись в виде озноба) наблюдались у 10/20 пациентов, которым вводили специфические Fab, по сравнению с 26/29 пациентами группы контроля ( $p < 0,01$ ). По сравнению с контрольными группами, у группы, получившей анти-TNF-Fab, максимальное повышение температуры, частоты пульса, и систолического кровяного давления во время JHP был значительно более низкими ( $p < 0,01$ ,  $< 0,0001$ ,  $< 0,01$ , соответственно).

Были проведены эксперименты, в которых участвовали пациенты, находящиеся в клинике Black Lion Hospital или в близлежащих клиниках, в том случае, если в их мазках крови обнаружили спирохету *Borrelia*

Критерии исключения из эксперимента

1. Дети моложе 12 лет

2. Беременные женщины

3. Пожилые люди (в возрасте более 60 лет) или сильно ослабленные с тяжелыми клиническими симптомами других острых заболеваний, например, таких как гипотензия, заметная желтуха, сильное истощение, и другие признаки недостаточного питания, склонность к сильному кровотечению, наличие сыпи при тифе, признаки активного туберкулеза легких, или легочной консолидации, состояние комы, менингит, сердечные респираторные заболевания или кома и "порхающий" тремор, эпилептические приступы, зафиксированные в истории болезни, и очаговые неврологические симптомы.

4. Пациенты с продолжительным сильным ознобом, гипотензией, или гипертермией, и другими симптомами спонтанной реакции ("кризис").

5. Пациенты, принимающие другие антибиотики.

К исследованиям и лечению допускались только те пациенты, которые давали свое информированное согласие на данные исследования и лечение.

Исходная информация

История болезни, включая продолжительность и спектр симптомов, а также предварительное обследование физического состояния организма были зарегистрированы в соответствии со стандартной *pro forma*.

Исследования

Пациенту в переднюю локтевую вену вводили политетрафторэтиленовую канюлю, снабженную трехходовым вентилем, и пациента выдерживали на гепаринизированном физиологическом растворе. Брали пробы крови для анализа на микрогематоциты, на полное число лейкоцитов (WBC), число спирохет, уровни билирубина, ферментов печени, креатинин, или мочевины. Гемокультуру исследовали для обнаружения ассоциированных бактериальных инфекций (особенно тифозных).

Как минимум 30 пациентов и как максимум 50 пациентов было произвольно отобрано для введения им внутривенно либо Fab-фрагментов овечьего поликлонального иммуноглобулина против TNF (ATNF-Fab), или идентичного на вид плацебо (контрольные Fab). 10 пациентов получали лишь изотонический физиологический раствор.

Рано утром в день исследований, пациенты комфортно лежали в постели. Температуру измеряли с помощью электронного ректального термометра. Регистрировали также давление крови, частоту пульса и частоту дыхания.

Обработка

Пациентам, чьи первоначальные ректальные температуры не изменялись более чем на  $0,5^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут, вводили путем медленного (в течение 30 минут) внутривенного вливания 100 мл ATNF-Fab или контрольных Fab (содержимое сосудов, а именно  $4 \cdot 1,5$  г лиофилизованного суммарных Fab, растворенных в 10 мл воды для инъекций, и разведенных до 100 мл изотоническим физиологическим раствором)

или 100 мл изотонического физиологического раствора. Эта доза суммарных Fab-фрагментов иммуноглобулина соответствует дозе приблизительно 120 мг/кг, которая содержит около 20 мг специфических анти-TNF Fab.

После завершения 30-минутного вливания, пациентам вводили внутримышечно (в переднюю мышцу бедра, разделенного на два участка, если это необходимо) стандартное противомикробное средство, а именно 600 000 ед. прокаинапенициллина.

#### Оценка

Ректальные температуры, кровяное давление, частота пульса, частота дыхания и симптомы регистрировали в следующие интервалы времени (0 = введение пенициллина): -60, -45, -30, 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180 мин; 4,8 и 24 ч. Венозную кровь для подсчета числа спирохет, числа WBC (лейкоцитов), и числа цитокинов (TNF $\alpha$ , 1L - 1 $\beta$ ; 1L - 8 и 1L - 6) брали в следующие интервалы времени: -30, 0, 60, 90 мин; 2, 4, 8 и 24 час.

На протяжении всего эксперимента, пациентам разрешали пить.

Сильная реакция JНР ожидалась через 60-90 минут после введения пенициллина.

#### Материалы и методы

TNF-специфические овечьи полные Fab-фрагменты, используемые в клинических испытаниях, получали в соответствии со следующими процедурами:

#### Иммуноген

Антиоксин к TNF $\alpha$  представлял собой Fab-фрагмент, продуцированный путем иммунизации овцы рекомбинантным чел. TNF (hg TNF $\alpha$ ), Hg TNF $\alpha$ , продуцировали в E. coli путем экспрессии синтетического гена, сконструированного на основе известной кДНК, кодирующей чел. TNF (коммерчески доступный продукт, поставляемый British Biotechnology). Рекомбинантный белок, который имел молекулярную массу приблизительно 17,5 кДа, очищали до чистоты более чем 97%. Каждый пул иммуногена анализировали на чистоту, молекулярную массу, и цитотоксическую активность, а затем инъецировали овцам. Последний тест проводили путем анализа с использованием клеток L929 мышинной соединительной ткани.

#### (i) Иммунизация

Группу из 10 овец иммунизировали путем подкожной инъекции на 6 участках. Иммунизацию проводили с убывающими дозами hg TNF $\alpha$ , смешанного либо с полным, либо с неполным адьювантом Фрейнда, с последующими процедурами, осуществляемыми в соответствии со схемой иммунизации, описанной в примерах 1 и 2. Овец иммунизировали с интервалами времени в один месяц.

#### (ii) Взятие образцов и проб крови

Через две недели после каждой иммунизации, у овец либо брали образцы для анализа (5 мл), либо брали пробы крови (500-700 мл) из яремной вены. Пробы крови переносили в стерильные апиrogenные сосуды, оставляли для свертывания (в случае 5 - мл образца), или слегка вращали для стимуляции и более быстрого свертывания (в случае проб крови). Сгусток крови центрифугировали, а сыворотку (в виде

супернатанта) отсасывали через стерилизующие (0,22 мкм) фильтры в гамма-облученные полиэтиленовые пакеты.

#### (iii) Оценка образцов/проб крови

Через 6 и 22 недели после первичной иммунизации, для каждой овцы из группы оценивали титр антител с использованием простого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

TNF $\alpha$  связывали при высоком pH (9,6) с 96-луночным планшетом для твердофазного иммуноферментного анализа, и инкубировали с возрастающими разведениями сыворотки. Hg TNF $\alpha$ -специфические антитела в сыворотке связывались с планшетом, а несвязанные антитела затем удаляли путем промывания.

Затем добавляли "второе" антитело, продуцированное в ослах и направленное против овечьих иммуноглобулинов, которое было конъюгировано с ферментом (пероксидазой хрена, HRP). В присутствии подходящего субстрата, HRP катализирует хромогенную реакцию, продукт которой является пропорциональным концентрации антитела в овечьей сыворотке. Затем образцы крови с титром более чем 1/30 000, объединяли с получением сывороточного пула от 10 овец. Овцы, которые не давали такого титра, были удалены из эксперимента.

Отдельных овец не подвергали оценке после взятия образцов через 22 недели.

#### (iv) Оценка сывороточного пула

Тесты на стерильность и содержание эндотоксинов осуществляли для каждого сывороточного пула, который, для использования его в изготовлении лекарственного средства, должен быть стерильным и содержать менее чем 1,25 э.ед/мл (э.ед. - эндотоксиновая единица - прим. пер.).

Сбор пулов, и все последующие стадии осуществляли в чистом помещении в условиях класса 100.

Каждый месяц пулы оценивали на титры с помощью ELISA, а также на концентрацию специфических антител с использованием мелкомасштабной аффинной очистки. Этот метод предусматривает пропускание иммунной сыворотки через аффинную колонку с небольшим количеством (1 г) hg TNFL-Сефарозы при селективной концентрации hg TNFL-специфических IgG. Эти IgG могут быть затем элюированы, и определена их концентрация.

Для использования в изготовлении лекарственного средства, пулы должны содержать по крайней мере 2 г/л специфического антитела.

#### (vi) Очистка иммуноглобулинов

Сывороточные фракции иммуноглобулина отделяли от других сывороточных белков, не представляющих терапевтической ценности, путем осаждения солью.

Короче говоря, сульфат натрия (сорт USP 36%, 25°C апиrogenный и стерильный) в течение 15 минут при температуре 25°C смешивали с объединенной сывороткой. Преципитат, полученный в результате этой процедуры, осаждали путем центрифугирования, а супернатант отсасывали. Затем осадок два раза промывали стерильным отфильтрованным раствором сульфата натрия (18%), концентрируя осадок после каждой промывки путем центрифугирования. Конечный осадок

ресуспендировали в стерильном изотоническом (0,9%) солевом растворе, а затем фильтровали через стерильный фильтр (0,2 мкм).

Анализ на стерильность и отсутствие эндотоксинов, а также титров проводили на данной стадии с использованием:

(I) теста на стерильность, USP (отсутствие 7-дневного роста)

(II) LAL-тест на эндотоксины

(III) Жидкостной экспресс-хроматографии белков методом геля-фильтрации (GF) (GF-FPLC)

(IV) Сравнения с необработанной сывороткой методом ELISA.

Образцы, имеющие чистоту на 85% и титр на 85% больше, чем необработанная сыворотка, были использованы для продуцирования Fab. Концентрация иммуноглобулина на этой стадии составляла приблизительно 25 г/л, как показало измерение оптической плотности при 280 нм (с использованием коэффициента экстинкции 15,1% 280 нм для IgG).

(V) Ферментный гидролиз

Fab-фрагменты иммуноглобулина получали путем инкубирования очищенного иммуноглобулина с растительным ферментом папаином, который сам по себе связывается с твердофазным носителем, что позволяет, после гидролиза, удалить фермент из гидролизной смеси.

К IgG-препарату в присутствии восстановителя цистеина и EDTA (для сохранения ферментной активности) добавляли ферментную матрицу, и смесь оставляли на 24 часа при 37 °C для прохождения реакции гидролиза. По истечении этого времени, реакцию завершали путем центрифугирования смеси, в результате чего достигали две цели, а именно, удаляли из раствора иммобилизованный фермент, и избегали необходимости добавлять большие количества йодоацетамидного блокирующего агента. Затем раствор подвергали ультрафильтрации через 10 кДа-полисульфоновой ультрафильтр (содержащий предварительный фильтр из 0,45 мкм-стекловолкна), и промывали 10 объемами физиологического раствора (0,9%, стерильного и апиrogenного) для удаления всех следовых количеств цистеина, EDTA, и любых Fc-фрагментов. Процедуры промывки обеспечивали уровни солевых примесей менее чем 2 млн.д.

И наконец, стерильные апиrogenные Fab-фрагменты фильтровали через стерилизующий 0,22 мкм-фильтр. На этой стадии брали образцы для оценки качества, а затем снова пропускали на GF-FPLC для контроля за эффективностью гидролиза, и после этого проводили также мелкомасштабную аффинную очистку для того, чтобы убедиться, что во время стадии гидролиза h $\gamma$  TNF $\alpha$ -связывающая активность сохранилась на прежнем уровне. На этой стадии также осуществляли тест на стерильность и LAL-тест, и кроме того, проводили спектрофотометрическое определение концентрации. Концентрация Fab на этой стадии составляла приблизительно 60 г/л.

В результате проведенных процедур, стерильные апиrogenные (< 10 э.ед. /мл)

образцы, которые указывали на полный гидролиз с образованием Fab (т.е. отсутствие интактного IgG), и которые по крайней мере на 85% по сравнению с исходной сывороткой сохраняли свою связывающую способность, были готовы для заполнения флаконов.

(vi) Заполнение флаконов

30-миллилитровые флаконы из нейтрального боросиликатного стекла наполняли 6,0 граммами Fab-раствора, и закрывали пробками из бутилкаучука. Затем сосуды замораживали при -70°C в течение по крайней мере 30 минут, и переносили в стерильную сублимационную сушилку. В этой сушилке, сосуды выдерживали по крайней мере 48 часов, а затем герметично запаивали под вакуумом.

Для инъекций, содержимое флаконов разводили водой (10 мл). На осушенных Fab проводили следующие тесты:

(a) тест на полную USP-стерильность, LAL-тест, и тест на пирогенный кроличий эндотоксин.

(b) тест на концентрацию белка в восстановленном содержимом флакона с использованием метода Кьельдаля для определения азота.

(c) тест на остаточную влагу,

(d) тест на чистоту с использованием FPLC путем геля-фильтрации,

(e) тест на определение h $\gamma$  TNF  $\alpha$ -нейтрализующей способности посредством анализа на цитотоксичность с использованием клеток L929.

QC-тест (тест на качество)

Осуществляли следующие тесты:

In vitro

Тест для оценки чистоты с помощью жидкостной экспресс-хроматографии (FPLC).

Тест на стерильность.

Лимулус-тест (проба с лизатом амебоцитов) (LAL) на пироген.

In vivo

Испытание кроликов на пироген

Испытания на острую токсичность, проводимые на мышах и морских свинок.

Все партии были рандомизированы для использования в испытаниях двойным слепым методом.

Подсчет лейкоцитов

Общее количество WBC подсчитывали с использованием гемоцитомера для подсчета клеток крови

Спирохеты

Мазки крови окрашивали по методу Райта, и исследовали с использованием оптического микроскопа.

Цитокины

TNF $\alpha$ , 1L-1 $\beta$ , 1L - 8 и 1L - 6 определяли с помощью иммуноанализа.

Наборы для иммунорадиометрического анализа в целях подсчета цитокинов закупили у фирмы Medgenix Diagnostics SA, B -6220

Результаты:

1. Тяжелая клиническая реакция наблюдалась после введения пациенту физиологического раствора в качестве контроля. После того, как количество спирохет упало сразу после введения пенициллина (время = 0), дыхание пациента участилось, а температура повышалась, достигая иногда около 107 °F. На этой фазе пациент становился особенно уязвимым и может умереть от очень высокой температуры.

2. В эксперименте участвовали два пациента, которые имели нормальную температуру до начала эксперимента. Затем, у пациента, получившего физиологический раствор, наблюдалось повышение температуры, тогда, как у пациента, получившего анти-TNF $\alpha$ -Fab, температура оставалась постоянной (фиг. 7).

3. В эксперименте участвовали также два пациента, которые имели высокие температуры к началу эксперимента. У пациента, получившего физиологический раствор, наблюдалось повышение температуры, тогда, как у пациента, получившего анти-TNF $\alpha$ -Fab-температура вообще не повышалась и резко снижалась до нормальной (фиг. 8).

4. Исследование 59. Уровень цитокинов (1L-6, TNF $\alpha$ , 1L-8 и 1L-1 $\beta$ ) у пациентов, получивших физиологический раствор, не изменялся в интервалы времени между - 30 час. и 0 (0 = введение пенициллина). У большинства пациентов, уровни цитокинов достигали максимума через 4 часа.

Исследование 027. Уровни цитокинов у пациентов, получивших конт. Fab, не показали изменения в интервалы времени между - 30 и 0 (0 = введение пенициллина). Максимальный уровень наблюдался через 4 часа.

Исследование 004. Уровни цитокинов у пациентов, получивших анти-TNF $\alpha$ -Fab, резко снижались, по сравнению с контролем, в интервалы времени между - 30 час. и 0 (0 = введение пенициллина). Уровень других цитокинов оставался на приемлемом уровне, либо показывал значительно более низкий пик.

На фиг. 9 показаны средние максимальные уровни TNF $\alpha$  для пациентов, которым были введены анти-TNF $\alpha$ -Fab или контрольные Fab, и для пациентов, которым был введен физиологический раствор. Кроме того, в Таблице 2 показаны эквивалентные данные для 1L - 8 и 1L - 6.

В Таблице 3 показаны приступы реакции Джарича-Херксхеймера у пациентов, которым были введены контроль в виде физиологического раствора, либо Fab-контроль, либо анти-TNF $\alpha$ -Fab. После введения анти-TNF $\alpha$ -Fab не наблюдалось умеренных (2+) и сильных (3+) реакций. Клинические проявления JHR в виде озноба наблюдались у 10/20 пациентов, получавших анти-TNF-Fab по сравнению с 26/29 пациентами, которые получали контроль ( $p < 0,01$ ) У анти-TNF-группы наблюдались значительно более низкие уровни повышения температуры, частоты пульса, и систолического кровяного давления во время JHR, чем у пациентов контрольной группы ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,0001$ , и  $p < 0,01$ , соответственно).

Пример 8: Введение пациентам, получившим ОКТЗ-лечение, анти-TNF $\alpha$ -Fab-фрагментов

ОКТЗ продуцировали из посевного материала родительский гибридомы (ATCC CP 8001 (Американская коллекция типовых культур, 12301, Parklawn Drive, Rockvilles, MD 20852-1776, США). Иммуноглобулин очищали из асцита, и приготавливали препараты. Схема лечения с использованием ОКТЗ описана в Ortho Study Group (1985) N. Engl. J. Med. 313, 337 - 342.

Схема лечения с использованием ОКТЗ заключалась в следующем: пациенту, страдающему от реакции отторжения трупного трансплантата почки, инъекировали 5 мг ОКТЗ в течение 2 - 4 мин (i. v.) и эти инъекции повторяли ежедневно в течение 10 или 14 дней (всего вводили 50 или 70 мг мышиноного моноклонального антитела). (Поликлональная антисыворотка против Т-лимфоцитов (которая не является аффинно-очищенной) может быть также введена путем внутривенного вливания, но в гораздо более высокой дозе (100 - 300 мг) и в течение более длительного периода (а именно, около 6 час.). Такие вливания также должны проводиться ежедневно в течение 10-15 дней).

Во время первой инъекции ОКТЗ, практически каждый пациент страдал от тяжелых признаков и симптомов, включая повышение температуры (по крайней мере у 90% пациентов), головные боли, тошноту и рвоту.

Fab-фрагменты получали как описано в примерах 3 или 7. Эндогенные уровни TNF составляли 1 мкг/л или менее, и ограничивались областью внеклеточной жидкости (около 15 л). Для ослабления действия возрастающих уровней TNF и шоковых симптомов, индуцированных ОКТЗ, дозу 5 мг или 10 мг анти-TNF $\alpha$ -Fab-фрагментов вводили в то же самое время, что и первую дозу ОКТЗ. Перед введением ОКТЗ и анти-TNF $\alpha$ -Fab-фрагментов, пациентам вводили иммунодепрессанты, а именно, суточные дозы 1,0 мг/кг преднизолона и 142 мг/кг азатиоприна. После начала введения ОКТЗ и анти-TNF $\alpha$ -Fab-фрагментов, пациентам вводили суточные дозы 0,6 мг/кг преднизолона и 30 мг/кг азатиоприна.

#### Формула изобретения:

1. Способ нейтрализации TNF $\alpha$  у пациента, нуждающегося в такой нейтрализации, отличающийся тем, что указанному пациенту вводят IgG - Fab-фрагмент, обладающий реактивностью по отношению к TNF $\alpha$ , а указанный Fab-фрагмент происходит от поликлонального IgG.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный пациент страдает септическим шоком или имеет симптомы септического шока.

3. Способ предупреждения или частичного ослабления септического шока или симптомов септического шока у пациента, отличающийся тем, что указанному пациенту вводят IgG - Fab-фрагмент, обладающий реактивностью по отношению к TNF $\alpha$ , а указанный фрагмент происходит от поликлонального IgG.

4. Способ по п.2 или 3, отличающийся тем, что симптомы септического шока вызваны введением моноклонального антитела ОКТЗ или функционального эквивалентного антитела.

5. Способ по п.2 или 3, отличающийся тем, что симптомы септического шока вызваны реакцией Джарича-Херксхеймера.

6. IgG - Fab-фрагмент, являющийся реактивным по отношению к TNF $\alpha$  и предназначенный для использования его в медицине, происходит от поликлонального

IgG.

7. IgG - Fab-фрагмент по п.6, отличающийся тем, что его применяют в изготовлении лекарственного средства для лечения пациентов, нуждающихся в нейтрализации  $TNF\alpha$ .

8. IgG - Fab-фрагмент по п.7, отличающийся тем, что указанный пациент страдает септическим шоком или имеет симптомы септического шока.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая IgG - Fab-фрагмент, обладающий реактивностью по отношению к  $TNF\alpha$ , и физиологически приемлемый носитель, где указанный Fab-фрагмент происходит от поликлонального IgG.

Приоритет по пунктам:  
03.06.93 - по пп.1 - 3, 6 - 9;  
10.02.94 - по пп.4 и 5.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

RU 2 1 3 9 0 9 2 C 1

RU 2 1 3 9 0 9 2 C 1

Таблица 1

Количе-  
ство не-  
дель

Номер  
ИММУНИЗАЦИИ

Доза<sup>14</sup>  
(мкг)

Образец  
или кровь

Обработанный  
образец

Week Number	Immunization Number	Dose ( $\mu\text{g}$ )	Sample or Bleed	Sample Processing
0	I	160		
2				
4	R1	80		
6			Образец Sample	IS
8	R2	80		
10				
12	R3	80		
14				
16	R4	80		
18				
20	R5	80		
22			Образец Sample	IS
24	R6	80		
26			КРОВЬ Bleed	P
28	R7	80		
30			КРОВЬ Bleed	P
32	R8	80		
34			КРОВЬ Bleed	P
36	R9	80		
38			КРОВЬ Bleed	P
40	R10	80		
42			КРОВЬ Bleed	P
44	R11	80		
46			КРОВЬ Bleed	P
48	R12	80		
50			КРОВЬ Bleed	P
52	R13	80		

RU 2139092 C1

RU 2139092 C1

Таблица 2: Максимальные уровни цитокинов в интервалы времени  
между 0-8 час.

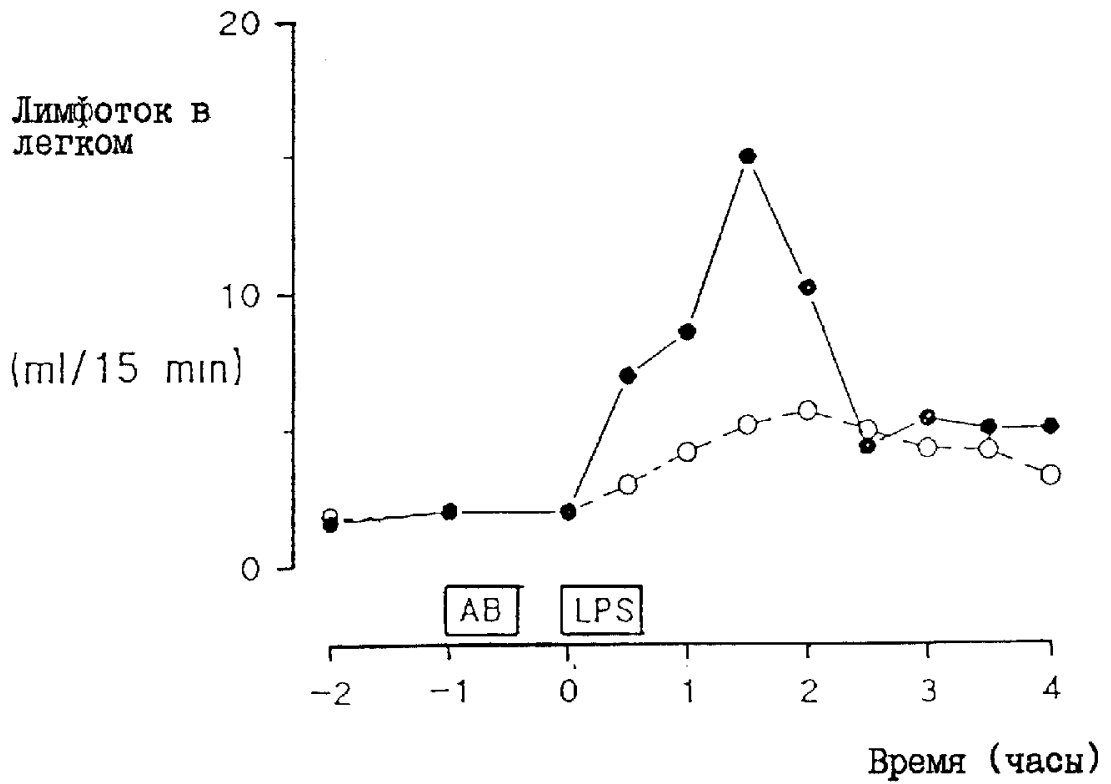
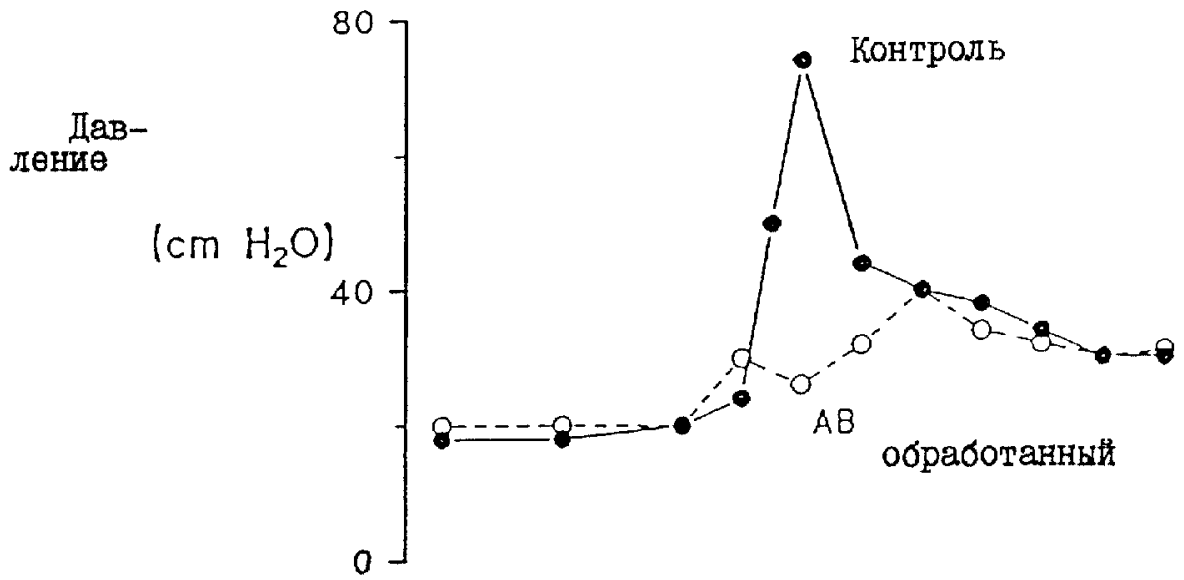
Цитокин	Контроль, физ. раст., среднее	анти-TNF, среднее	p
TNF	2200 нг/л	10 нг/л	0,001
IL-8	2200 нг/л	200 нг/л	0,002
IL-6	66 мкг/л	16 мкг/л	0,01

Таблица 3: Приступы реакции Джарича-Хейцхеймера

Реакция Джа- рича-Хейцхей- мера ( J-HP)	0	1+	2+	3+	Полная J-HP
Физ.раст., контроль	2	5	1	2	8
(%)	20	50	10	20	80
Fab-контроль	0	8	10	1	19
(%)	5	40	50	5	95
Fab против TNF $\alpha$	10	10	0	0	10
(%)	50	50	0	0	50

RU 2139092 C1

RU 2139092 C1

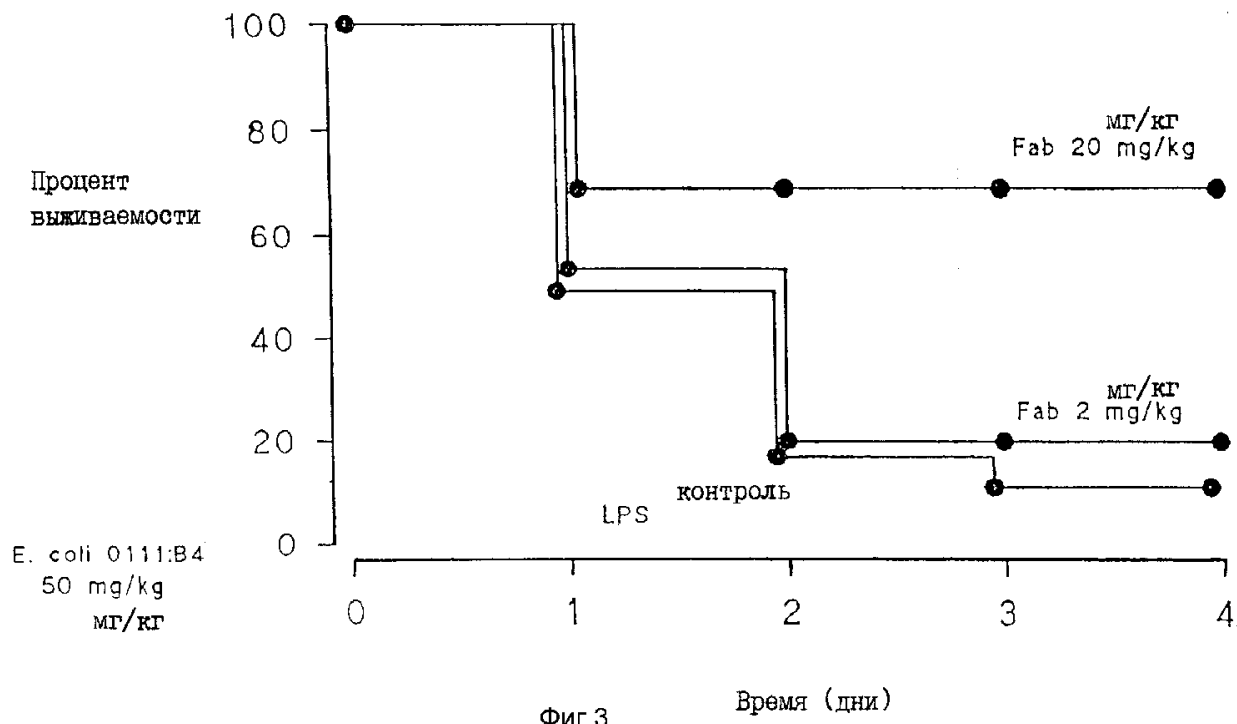


Фиг.2

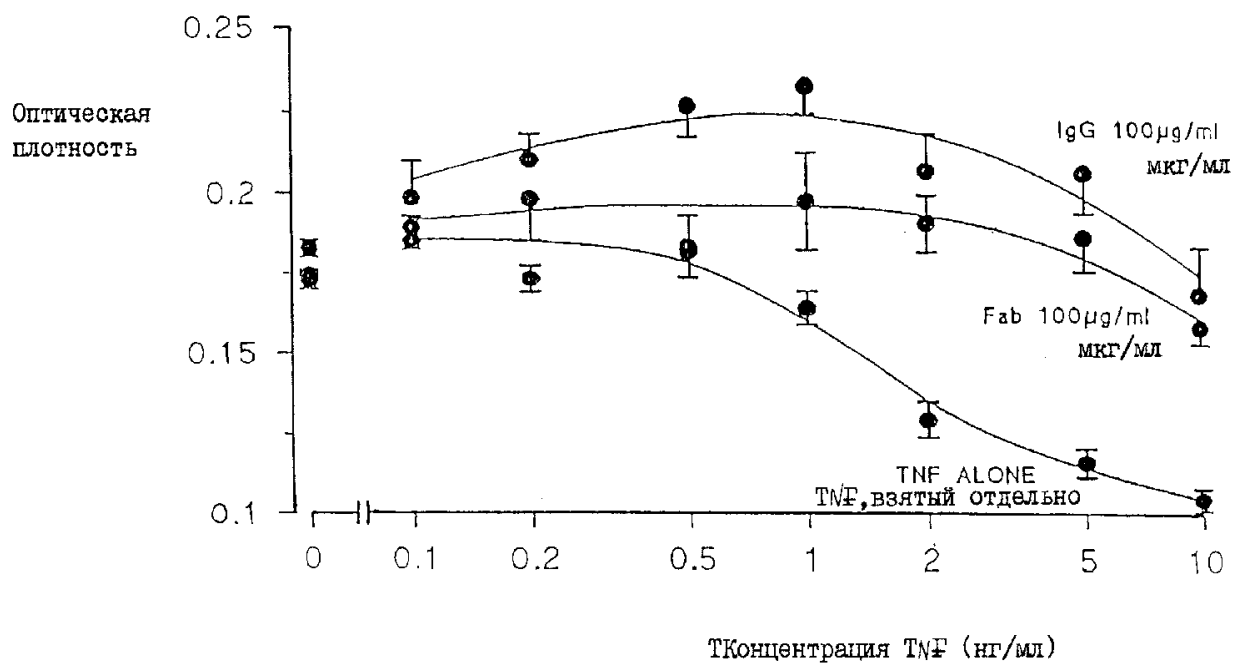
RU 2139092 C1

RU 2139092 C1





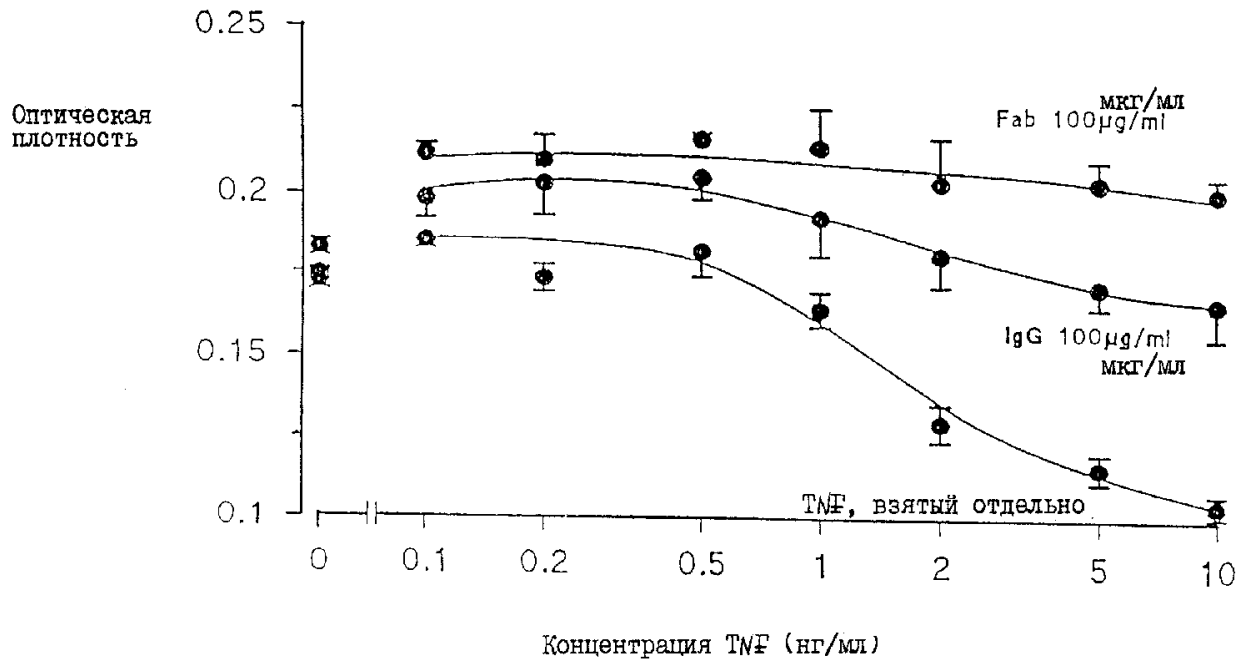
Фиг.3



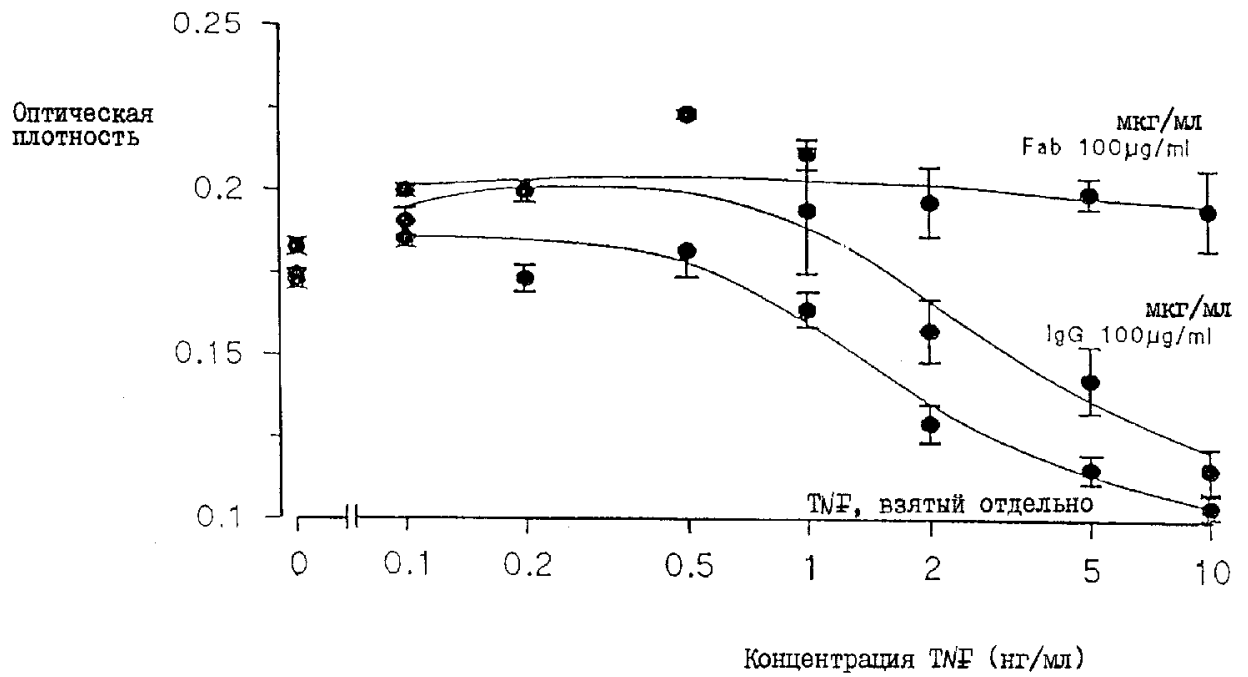
Фиг.4

RU 2139092 C1

RU 2139092 C1



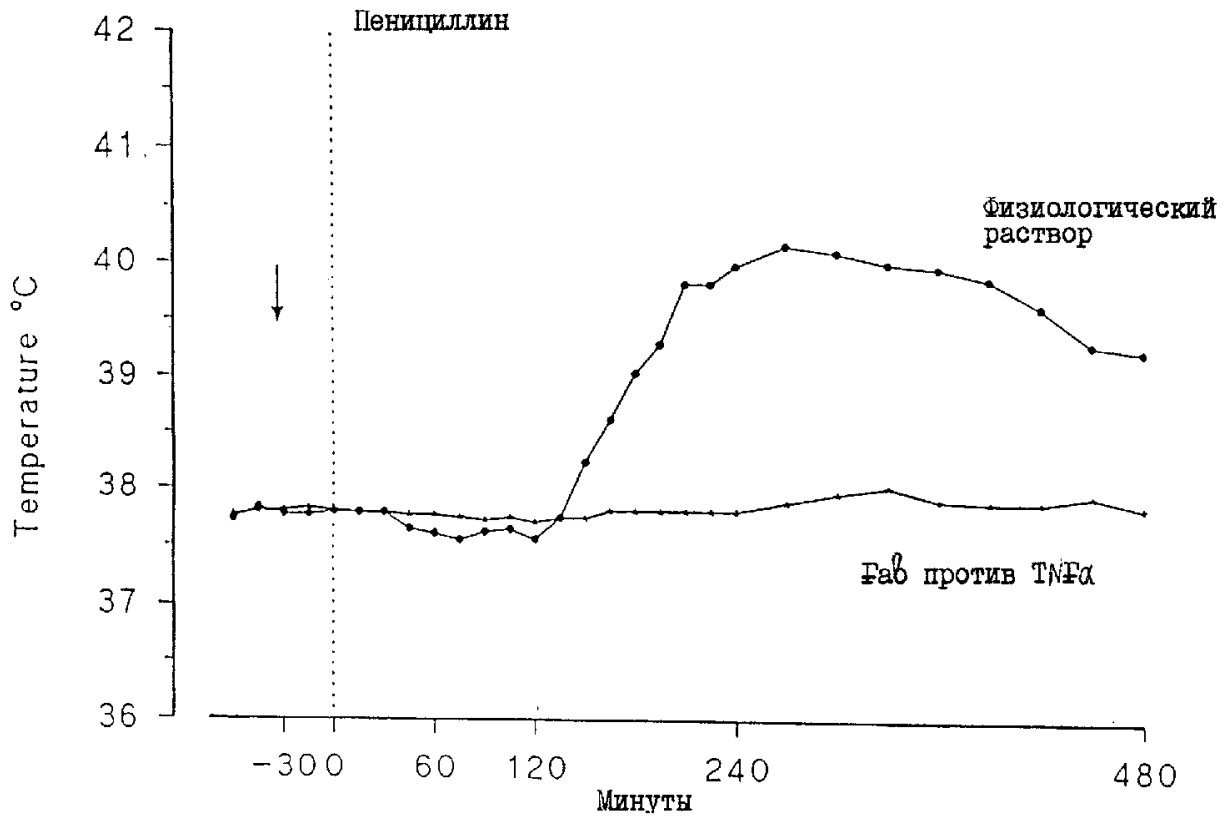
Фиг.5



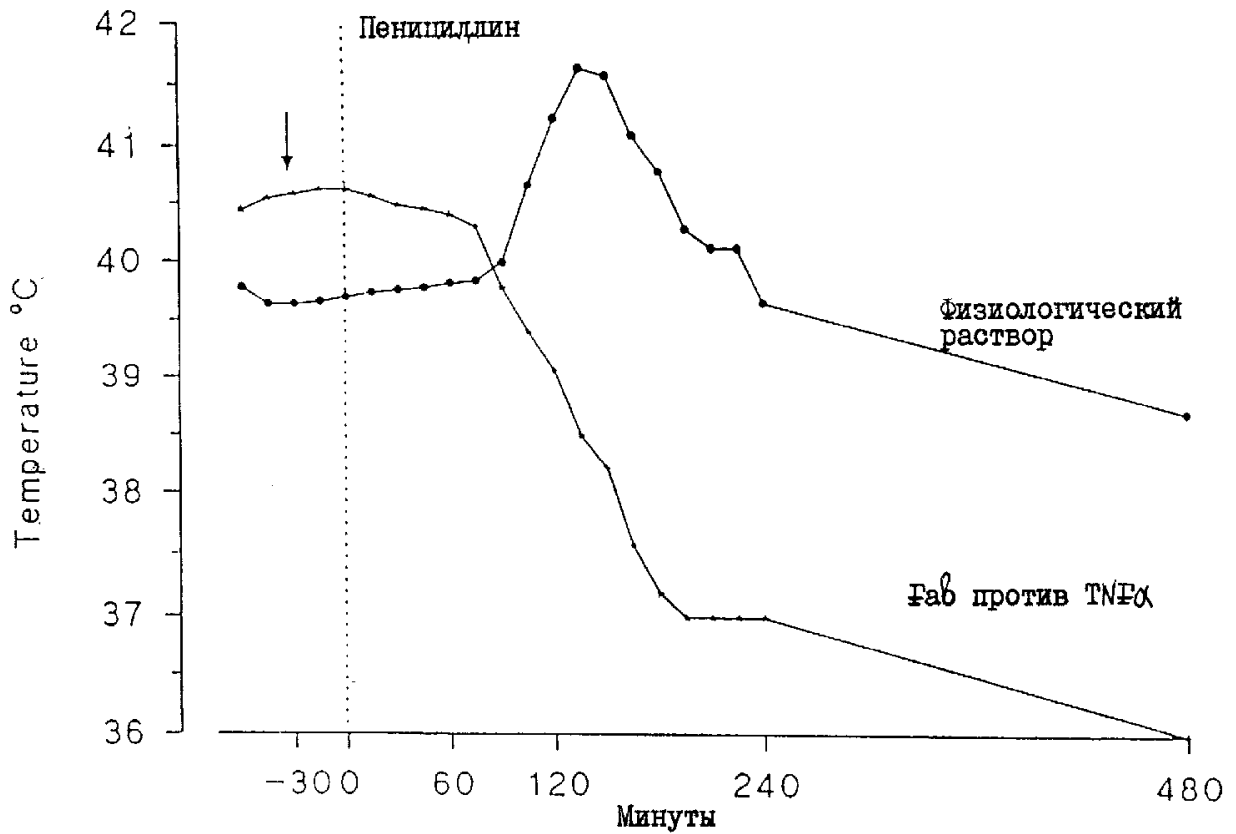
Фиг.6

RU 2139092 C1

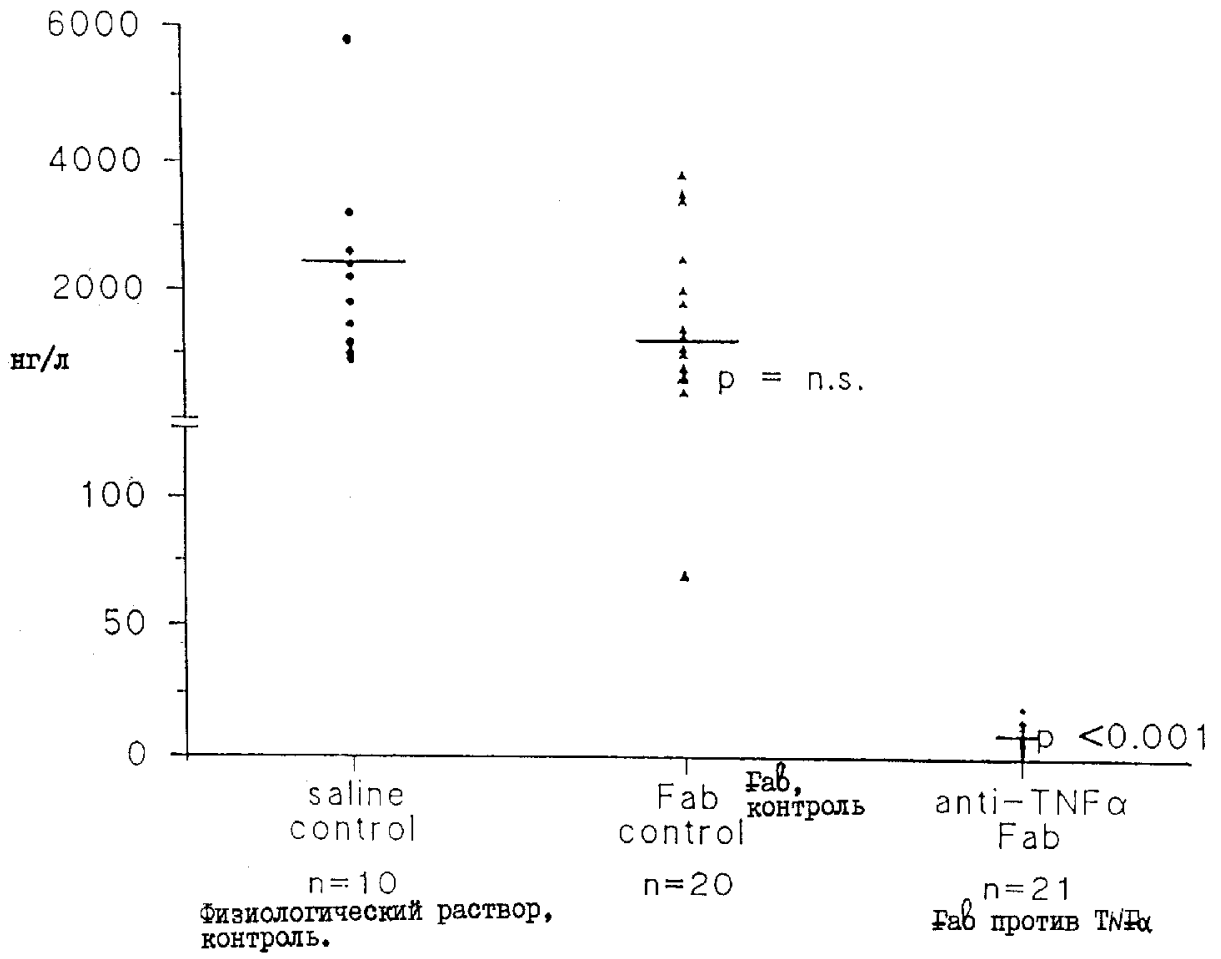
RU 2139092 C1



Фиг.7



Фиг.8



Фиг.9

RU 2139092 C1

RU 2139092 C1