

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046827**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.04.25**

**(21)** Номер заявки  
**202190518**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.08.13**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)

---

**(54) АНТИ-IL-1 $\beta$  АНТИТЕЛО И ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 201810920403.6

**(32)** 2018.08.14

**(33)** CN

**(43)** 2021.06.01

**(86)** PCT/CN2019/100343

**(87)** WO 2020/034941 2020.02.20

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
АКЕСО БАЙОФАРМА, ИНК. (CN)

**(72)** Изобретатель:  
Ли Байюн, Ся Юй, Ван Чжунминь  
Максвелл, Чжан Пэн (CN)

**(74)** Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

**(56)** CN-A-104870015  
CN-A-103328511  
CN-A-103554264  
CN-A-107074942  
CN-A-105324396  
CN-A-102655880  
CN-A-101678104  
CN-A-1780855  
CN-A-1745103  
CN-A-1484652  
CN-A-1395581

---

**(57)** Изобретение относится к области иммунологии и относится к анти-IL-1 $\beta$  антителу и его фармацевтической композиции, а также к их применению. В частности, изобретение относится к анти-IL-1 $\beta$  антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 17-SEQ ID NO: 19 соответственно и переменная область легкой цепи антитела содержит LCDR1-LCDR3 SEQ ID NO: 20-SEQ ID NO: 22 соответственно. Описанное здесь антитело может эффективно связываться с человеческим IL-1 $\beta$ , блокировать связывание IL-1 $\beta$  с его рецептором IL-1R1 и ингибировать активацию последующих сигнальных путей IL-1 $\beta$ . Антитело может применяться для получения лекарственного средства для предотвращения и лечения аутоиммунных заболеваний, периодических криопирин-ассоциированных синдромов у детей и взрослых, системного ювенильного идиопатического артрита, подагрического артрита, сердечно-сосудистых заболеваний или опухолей.

---

**B1**

**046827**

**046827**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области иммунологии и относится к анти-IL-1 $\beta$  антителу, его фармацевтической композиции и их применению. В частности, настоящее изобретение относится к антителу против человеческого IL-1 $\beta$ ; более конкретно, настоящее изобретение относится к моноклональному антителу против человеческого IL-1 $\beta$ ; и, более того, более конкретно, настоящее изобретение относится к гуманизированным моноклональным антителам против человеческого IL-1 $\beta$ .

### Уровень техники

Семейство интерлейкинов-1 (IL-1) состоит из двух провоспалительных факторов (IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$ ) и антагониста рецептора IL-1 (IL-1Ra), где IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  могут эффективно активировать рецепторы IL-1, а IL-1Ra может прикрепляться к поверхности рецепторов IL-1, блокируя передачу сигналов. IL-1 $\beta$  синтезируется в основном моноцитами и макрофагами. При расщеплении каспазой-1 белок-предшественник IL-1 $\beta$  может активироваться. Существует несколько подтипов лигандов, включая IL-1R1, IL-1R2, IL-1R3 (также известный как дополнительный белок рецептора IL-1 или IL-1RAcP), IL-1R4, IL-1R5, IL-1R6, IL-1R7, IL-1R8, IL-18BP и 2 сиротских рецептора (IL-1R9 и IL-1R10) в семействе рецепторов IL-1.

Недавно было обнаружено, что IL-1 $\beta$  способен связываться с IL-1R1 и IL-1R2. IL-1R1 (также известный как рецептор IL-1 типа 1 или IL-1R1) представляет собой трансмембранный рецептор, который связывается с IL-1 $\beta$  и IL-1RAcP с образованием рецепторного комплекса, активируя связанный с ним последующий внутриклеточный сигнальный путь и опосредуя связанные с IL-1 $\beta$  биологические эффекты. IL-1R2 имеет более высокое сродство к IL-1 $\beta$ , чем IL-1R1; однако IL-1R2 не может активировать соответствующий внутриклеточный сигнальный путь после связывания с IL-1 $\beta$  из-за его более короткого внутриклеточного сегмента. И IL-1R1, и IL-1R2 могут существовать в растворимой форме (Boraschi et al. *Immunological Reviews*. 281:197-232. (2018)).

IL-1 $\beta$  регулирует рекрутинг и активацию эффекторных клеток, участвующих во врожденном и адаптивном иммунитете, а также участвует в патогенезе хронических заболеваний, включая подагрический артрит; различные аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, рассеянный склероз и синдром периодической лихорадки, и аутовоспалительные заболевания, такие как системный ювенильный идиопатический артрит; а также в возникновении таких заболеваний, как криопирин-ассоциированные периодические синдромы у детей и взрослых. Недавно было подтверждено, что путь IL-1 $\beta$  участвует в возникновении опухолей, таких как острый миелоидный лейкоз, рак печени, рак легких, а также в развитии сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний, а препараты, нацеленные на IL-1 $\beta$ , показали хорошее терапевтическое и профилактическое действие (Cozzolino F. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2369 (1989); Nakazaki H. et al. *Cancer*. 70(3):709 (1992); Ridker P.M. et al. *Lancet*. 390(10105):1833-1842 (2017)).

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое и системное аутоиммунное заболевание с преобладающим поражением суставов. IL-1 $\beta$  играет ключевую роль в возникновении РА. Высокий уровень IL-1 $\beta$  присутствует в синовиальной жидкости пациентов с РА (van den Berg et al. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*. 13:577-97(1999)), а IL-1 $\beta$  опосредует инфильтрацию лейкоцитов и секрецию металлопротеиназ матрикса в суставах, вызывает дегградацию хряща и ингибирует синтез нового хрящевого матрикса, что приводит к разрушению суставов (van den Berg et al. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*. 13:577-97 (1999); Johnson L.L. et al. *Curr Opin Chem Biol*. 2:466-471 (1998)). У пациентов с РА IL-1 $\beta$  стимулирует дифференцировку и активацию остеокластов и участвует в возникновении эрозии костей в суставах, пораженных РА (Gravallese E.M. et al. *Ann Rheum Dis*. 61:ii 84-86 (2002); Ghivizzani S.C. et al. *J Immunol*. 1:3604-12 (1997); Horai R et al. *J Exp Med*. 191:313-20 (2000); Gravallese E.M. et al. *Arthritis Rheum*. 43:250-8 (2000); Takayanagi H et al. *Arthritis Rheum*. 43:259-69 (2000)). Кроме того, IL-1 $\beta$  способствует потере костной массы, а также инфильтрации лейкоцитов и образованию ткани паннуса в синовиальной оболочке, регулируя пути с участием ФНО- $\alpha$  и IL-6 (Strand V. et al. *Rheumatology (Oxford)*. 43:iii10-iii16 (2004)). Клинические исследования продемонстрировали, что антагонист IL-1 $\beta$  значительно облегчает физические признаки и симптомы РА (Mertens M. et al. *J Rheumatol*. 36(6): 1118-25 (2009)) и mAb против человеческого IL-1 $\beta$  канакинумаб (Paris®) значительно снижает активность заболевания у пациентов с РА (Alten R. et al. *Arthritis Res Ther*. 10:R67 (2008); Alten R. et al. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 12:153 (2011)).

Подагра представляет собой артропатию, связанную с кристаллами, вызванную отложением однозамещенного урата натрия, которая напрямую связана с гиперурикемией, вызванной нарушением метаболизма пуринов и/или снижением экскреции мочевой кислоты, и, в частности, относится к острому характерному артриту и хронической подагрической каменной болезни, в основном включает в себя артрит с острым началом, образование тофусов, хронический тофусный артрит, уратную нефропатию и литангиурию мочевой кислоты, в тяжелых случаях даже поражение суставов и почечную недостаточность. Подагра часто сопровождается абдоминальным ожирением, гиперлипидемией, гипертонией, диабетом 2 типа, сердечно-сосудистыми заболеваниями и т.д. IL-1 $\beta$  является фактором, влияющим на развитие подагрического воспаления (Cumpelik A. et al. *Ann Rheum Dis*. pii: annrheumdis-2015-207338 (2015)). Ис-

следование показало, что у пациентов с подагрическим артритом экспрессия как мРНК IL-1 $\beta$  отдельной мононуклеарной клетки, так и сывороточного IL-1 $\beta$  в периферической крови значительно выше, чем у здоровой контрольной группы, и эти показатели у группы острой фазы значительно выше, чем в группе хронической фазы и группе прерывистой фазы; концентрация сывороточного IL-1 $\beta$  положительно коррелирует с такими показателями, как скорость оседания лейкоцитов, нейтрофильных гранулоцитов и эритроцитов, что позволяет предположить, что IL-1 $\beta$  может участвовать как в остром, так и в хроническом подагрическом артрите, а также коррелирует со степенью воспаления; а концентрация сывороточного IL-1 $\beta$  в группе прерывистой фазы значительно выше, чем в здоровой контрольной группе, что позволяет предположить, что воспаление суставов и тканей может все еще существовать, хотя симптомы в суставах исчезают (Li Lingqin et al. Chinese Journal of General Practitioners. 14: 29-31 (2015)). Эксперимент на животных показал, что IL-1 $\beta$  играет важную роль как при остром, так и при хроническом подагрическом артрите, а кристаллы уратов стимулируют мононуклеарные клетки и фагоциты в крови и синовиальной жидкости, вызывая сильное высвобождение IL-1 $\beta$  (Di Giovine F.S. et al. J Immunol. 138: 3213-3218 (1987)). В модельном эксперименте на мышах было обнаружено, что блокатор IL-1 $\beta$  может предотвращать агрегацию нейтрофилов, вызванную внутривенной инъекцией кристаллов урата, и агрегация отсутствует на участках, лишенных рецепторов IL-1 $\beta$  у мышей (Martinon F. et al. Nature. 440:237-241 (2006)). Клинические исследования показали, что IL-1 $\beta$  вызывает выработку большого количества провоспалительных цитокинов во время острого приступа подагры (Amaral F.A. et al. Arthritis Rheum. 64: 474-484 (2012); Torres R. et al. Ann Rheum Dis. 68: 1602-1608 (2009)).

В клинических испытаниях по оценке эффективности и безопасности лечения подагры было обнаружено, что канакинумаб, моноклональное антитело против человеческого IL-1 $\beta$ , может эффективно облегчать клинические симптомы, такие как боль у пациентов с рефрактерным подагрическим артритом, что, очевидно, снижает частоту рецидивов подагры по сравнению с триамцинолоном ацетонидом и улучшает качество жизни (So A et al. Arthritis Rheum. 62: 3064-3076 (2010)). В другом клиническом исследовании было обнаружено, что канакинумаб, моноклональное антитело против человеческого IL-1 $\beta$ , может значительно снизить количество приступов подагры по сравнению с колхицином (Schlesinger N. et al. Ann Rheum Dis. 70: 1264-1271 (2011)). В настоящее время mAb канакинумаб одобрен Европейским агентством по лекарственным средствам для лечения пациентов, которые часто страдают от приступов подагрического артрита и не переносят нестероидные противовоспалительные препараты, колхицин и глюкокортикоиды или не реагируют на них (Lyseng-Williamson K.A. et al. BioDrugs. 27: 401-406 (2013)). Вышеупомянутые исследования показывают, что антитело против IL-1 $\beta$  может лечить подагру, облегчать симптомы и уменьшать рецидивы более эффективно по сравнению с существующими методами лечения, оказывая потенциальные профилактические и лечебные эффекты при приступе подагры.

Рассеянный склероз представляет собой хроническое демиелинизирующее заболевание, опосредованное в первую очередь Т-клетками подгрупп Th1 и Th17. Факторы семейства интерлейкинов IL-1 играют важную роль при развитии рассеянного склероза. IL-1 способствует прогрессированию заболевания за счет ускорения роста Т-клеток подгруппы Th17, а также приводит к распределению хемокина CXCL12 в сосудах головного мозга от нормального местоположения в паренхиме к обеим сторонам эндотелия до тех пор, пока не будет достигнуто деполяризирующее распределение, что приводит к утечке из сосудов и проникновению Т-клеток в паренхиму головного мозга во время раннего прогрессирования заболевания (Chih-Chung Lin et al. J Immunol. 198: 4553-4560 (2017)). Исследования на животных показали, что экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ) не индуцируется у мышей дефицитом IL-1 или IL-1R1, а лечение ингибиторами IL-1 $\beta$  может отсрочить начало, уменьшить тяжесть и сократить продолжительность ЕАЕ у мышей дикого типа (Chih-Chung Lin et al. J Immunol. 198: 4553-4560 (2017)).

Недавние клинические исследования также показали, что анти-IL-1 $\beta$  антитела оказывают противовоспалительное действие, антагонизируя путь IL-1 $\beta$ , что значительно снижает риск сердечно-сосудистых заболеваний. Атеросклероз и тромбоз являются патологической основой ишемической болезни сердца (Dalek os G.N. et al. J Lab Clin Med. 129: 300 (1997)). На кроличьей модели высокого уровня холестерина и атеросклероза было обнаружено, что экспрессия мРНК IL-1 $\beta$  и IL-1 $\beta$  повышена в липидных бляшках, а снижение синтеза IL-1 может замедлить прогрессирование атеросклероза (Dinarello C.A. et al. N Engl J Med. 328: 106 (1993)). Уровень IL-1 $\beta$  увеличивается во время инфаркта миокарда, а экспрессия IL-1 $\beta$  увеличивается как в плазме, так и в локальном участке инфаркта миокарда во время постинфарктного ремоделирования миокарда, что позволяет предположить, что IL-1 $\beta$  участвует в возникновении и прогрессировании гипертрофии миокарда, фиброза миокарда и недостаточности после инфаркта миокарда (Yue P. et al. Am J Physiol. 275 (1Pt2): H250 (1998)). Сердечная недостаточность представляет собой сложный синдром, и, согласно исследованиям, повышение уровня IL-1 происходит в циркулирующей крови пациентов с застойной сердечной недостаточностью (Blum A. et al. Am Heart J. 135 (2 Part 1): 181 (1998); Kapadia S. et al. Cardiol Clin. 16(4): 645 (1998)). IL-1 $\beta$  может участвовать в возникновении и прогрессировании застойной сердечной недостаточности, вызванной повышенной хронической нагрузкой; уровень сывороточного IL-1 $\beta$  заметно повышен у пациентов с сердечной недостаточностью III-IV степе-

ни, способствуя прогрессированию застойной сердечной недостаточности (Yndestad A. et al. *Curr Cardiol Rep.* 9: 236-41 (2007)). Фаза III клинического исследования CANTOS, оценивающего эффективность, безопасность и переносимость канакиумаба, антитела против человеческого IL-1 $\beta$ , при перенесенном инфаркте миокарда в сочетании с воспалительным атеросклеротическим сердечно-сосудистым заболеванием, показало, что анти-IL-1 $\beta$  антитело в сочетании со стандартным лечением значительно снижает частоту смертельных случаев в результате сердечно-сосудистых заболеваний, нефатального инфаркта миокарда и нефатальных церебрально-сосудистых нарушений у пациентов (Ridker P.M. et al. *N Engl J. Med.* 377: 1119-1131 (2017)).

Другой анализ когорты клинических исследований CANTOS антитела против человеческого IL-1 $\beta$  канакиумаб показал, что, анти-IL-1 $\beta$  антитело канакиумаб значительно снижает риск возникновения и смерти от рака легких (Ridker P.M. et al. 390(10105):1833-1842 (2017))*Lancet*. При культивировании *in vitro* клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) от пациентов было обнаружено, что экспрессия IL-1 повышена более чем у 80% пациентов с первичным ОМЛ, а IL-1 $\beta$  может значительно способствовать росту опухолевых клеток, в то время как антитела против IL-1 $\beta$  или IL-1 $\alpha$  эффективны в ингибировании роста опухолевых клеток (Cozzolino F. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2369 (1989)). У пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой уровень IL-1 в сыворотке был значительно повышен по сравнению со здоровой контрольной группой (Nakazaki H. et al. *Cancer.* 70 (3): 709 (1992)).

Криопирин-ассоциированные периодические синдромы (CAPS) у детей и взрослых представляют собой редкое заболевание, вызванное избыточным продуцированием IL-1 $\beta$  из-за мутации одного гена, что приводит к слабости, приливам, лихорадке, головной боли, артралгии и конъюнктивиту, которые могут возникать у новорожденных или младенцев, могут возникать ежедневно на протяжении всей жизни пациента и могут вызывать тяжелые заболевания включая глухоту, деформации костей и суставов, слепоту из-за поражения центральной нервной системы, а также почечную недостаточность, и быть потенциально смертельными в долгосрочной перспективе, вызывая преждевременную смерть в результате амилоидоза. CAPS у детей и взрослых включают в себя семейный холодовой ауто-воспалительный синдром (FCAS), синдром Макла-Уэллса (MWS), мультисистемное воспалительное заболевание с неонатальным началом, хронический детский неврологический кожный и суставной синдром и семейную холодовую крапивницу. Канакиумаб, антитело против человеческого IL-1 $\beta$ , может значительно облегчить клинические симптомы у пациентов с криопирин-ассоциированными периодическими синдромами (Yokota S. et al. *Clin Exp Rheumatol.* 35 Suppl 108 (6): 19-26. (2017); Kone-Paut I. et al. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*; 69: 903-911. (2017)), благодаря чему оно было одобрено для лечения криопирин-ассоциированных периодических синдромов (CAPS) у детей ( $\geq 4$  лет) и взрослых Управлением по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) и Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA).

Синдромы периодической лихорадки представляют собой группу редких аутоиммунных заболеваний, которые приводят к рецидивирующей и стойкой тяжелой лихорадке и патогенному воспалению за счет неинфекционной активации иммунной системы, часто приводят к инвалидности и могут сопровождаться артралгией, отеком, миалгией, сыпью и летальным исходом (Wurster V.M. et al. *Pediatr Ann.* 40 (1): 48-54 (2011)). Синдромы периодической лихорадки включают в себя периодический синдром, связанный с рецептором ФНО (TRAPS), синдром гипер-IgD (HIDS)/дефицит мевалонаткиназы (MKD) и семейную средиземноморскую лихорадку (FMF). Клинические исследования продемонстрировали, что mAb против человеческого IL-1 $\beta$  канакиумаб может быть эффективным при лечении синдромов периодической лихорадки (De Benedetti F. et al. *N Engl J. Med.* 378 (20): 1908-1919 (2018)). Таким образом, mAb против человеческого IL-1 $\beta$  канакиумаб был одобрен FDA и т.п. для лечения синдромов периодической лихорадки.

Системный ювенильный идиопатический артрит (SJIA) представляет собой уникальный подтип ювенильного идиопатического артрита, который в основном начинается с внесуставных проявлений, таких как длительная гиперпирексия, сыпь и анемия. Он обычно встречается у детей в возрасте 0-5 лет, в основном проявляется хроническим артритом и чаще всего сопровождается повреждениями органов и тканей разной степени. Его основными проявлениями являются лихорадка, сыпь и артралгия, и он имеет неблагоприятный прогноз, такой как низкий уровень долгосрочной ремиссии, высокий уровень дисфункции и инвалидности, а также высокий уровень смертности. (Woerner A. et al. *Expert Rev Clin Immunol.* 11 (5): 575-88. (2015)). Принято считать, что SJIA является аутовоспалительным заболеванием, а не аутоиммунным заболеванием (Sun Juan et al. *Progress in Modern Biomedicine.* 8: 1584-1588 (2016)). Клинические исследования продемонстрировали, что моноклональное антитело против человеческого IL-1 $\beta$  канакиумаб может эффективно лечить активный SJIA, сопровождающийся лихорадкой, и снижать дозы стероидов, а также значительно сокращать рецидивы SJIA (Orrock J.E. et al. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 9: 1015- 24. (2016)). Таким образом, моноклональное антитело против IL-1 $\beta$  канакиумаб одобрен FDA и т.п. для лечения системного ювенильного идиопатического артрита.

По-прежнему существует потребность в разработке новых анти-IL-1 $\beta$  антител.

### Сущность изобретения

После интенсивных исследований и творческих усилий авторы настоящего изобретения использовали экспрессионные системы клеток млекопитающих для экспрессии рекомбинантного IL-1 $\beta$ -His в качестве антигена для иммунизации мышей и получили гибридомные клетки путем слияния клеток селезенки мыши и клеток миеломы. Авторы настоящего изобретения получили следующую линию гибридомных клеток путем скрининга большого количества образцов: линия гибридомных клеток LT010, депонированная в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) 21 июня 2018 г. под регистрационным номером ССТСС NO: С2018133.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что линия гибридомных клеток LT010 может секретировать и продуцировать специфичное моноклональное антитело (названное 3Н6), которое специфично связывается с человеческим IL-1 $\beta$ , и это моноклональное антитело может очень эффективно блокировать связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1;

Кроме того, авторы настоящего изобретения творчески получили гуманизированные антитела против человеческого IL-1 $\beta$  (соответственно названные 3Н6Н1L1, 3Н6Н2L2, 3Н6Н3L3 и 3Н6Н4L1), из которых все могут эффективно связываться с человеческим IL-1 $\beta$ , блокировать связывание IL-1 $\beta$  с его рецептора (IL-1R1), и ингибировать активацию последующего пути передачи сигнала IL-1 $\beta$ . И эти гуманизированные антитела против человеческого IL-1 $\beta$  потенциально могут применяться при изготовлении лекарственных средств для уменьшения, предотвращения или лечения таких заболеваний, как ревматоидный артрит, подагра, рассеянный склероз, сердечнососудистые события и/или сердечно-сосудистые заболевания, опухоли, периодические криоприн-ассоциированные синдромы у детей и взрослых, синдромы периодической лихорадки и системный ювенильный идиопатический артрит.

Настоящее изобретение подробно описано ниже.

В одном аспекте настоящего изобретения относится к анти IL-1 $\beta$  антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где

антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 17-SEQ ID NO: 19 соответственно; и

антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 20-SEQ ID NO: 22 соответственно.

Предпочтительно, IL-1 $\beta$  представляет собой человеческий IL-1 $\beta$ .

Переменные области легкой цепи и тяжелой цепи определяют связывание антигена; переменная область каждой цепи содержит три гиперпеременные области, а именно определяющие комплементарность области, (CDR) (CDR тяжелой цепи (H) включают в себя HCDR1, HCDR2, HCDR3, а CDR легкой цепи (L) включают в себя LCDR1, LCDR2, LCDR3; определенные по Kabat et al., См. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), Volumes 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md). Описанные здесь антитела 3Н6, 3Н6Н1L1, 3Н6Н2L2, 3Н6Н3L3 и 3Н6Н4L1 имеют одинаковые HCDR1-3 и LCDR1-3, согласно анализу с помощью технических средств, хорошо известных специалистам в данной области техники, например, по базе данных VBASE2.

Аминокислотные последовательности трех областей HCDR переменной области тяжелой цепи являются следующими:

HCDR 1: GFSLSTSGMG (SEQ ID NO: 17),

HCDR 2: IYWDDDK (SEQ ID NO: 18),

HCDR 3: ARSAYYSFAY (SEQ ID NO: 19);

и аминокислотные последовательности трех областей CDR переменной области легкой цепи являются следующими:

LCDR 1: QDVDTD (SEQ ID NO: 20),

LCDR 2: WAS (SEQ ID NO: 21),

LCDR 3: QQYSSYPT (SEQ ID NO: 22).

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 14; и

переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело выбрано из

(1) VH, указанной в SEQ ID NO: 2, и VL, указанной в SEQ ID NO: 4;

(2) VH, указанной в SEQ ID NO: 6, и VL, указанной в SEQ ID NO: 8;

(3) VH, указанной в SEQ ID NO: 10, и VL, указанной SEQ ID NO: 12; и

(4) VH, указанной в SEQ ID NO: 14, и VL, указанной в SEQ ID NO: 16.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb, фрагмента определяющий комплементарность области, одноцепочечного антитела (например, scFv), гуманизированного антитела, химерного антитела и диатела.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело связывается с белком IL-1 $\beta$  с K<sub>D</sub> менее 10<sup>-5</sup> М, например, менее 10<sup>-6</sup> М, менее 10<sup>-7</sup> М, менее 10<sup>-8</sup> М, менее 10<sup>-9</sup> М или менее 10<sup>-10</sup> М или менее; предпочтительно, K<sub>D</sub> измеряют с помощью прибора для измерения молекулярного взаимодействия Biacore.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело связывается с белком IL-1 $\beta$  с EC<sub>50</sub> менее примерно 100 нМ, например, менее примерно 10 нМ, менее примерно 1 нМ, менее примерно 0,9 нМ, менее примерно 0,8 нМ, менее примерно 0,7 нМ, менее примерно 0,6 нМ, менее примерно 0,5 нМ, менее примерно 0,4 нМ, менее примерно 0,3 нМ, менее примерно 0,2 нМ, менее примерно 0,1 нМ или менее. В частности, EC<sub>50</sub> измеряется методом непрямого твердофазного ИФА.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело содержит не-CDR-область, полученную от видов, отличных от мышей, например из человеческого антитела.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения константные области антител являются гуманизированными, например, константные области тяжелой цепи представляют собой С-область цепи гамма-1 Ig, такую как ACCESSION: P01857, или С-область цепи гамма-4 Ig, такую как ACCESSION: P01861.1; и константные области легкой цепи представляют собой С-область каппа-цепи Ig, такую как ACCESSION: P01834.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело представляет собой моноклональное антитело, продуцируемое линией гибридомных клеток LT010, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) под регистрационным номером ССТСС NO: C2018133.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело.

В другом аспекте настоящего изобретения относится к конъюгату антитело-лекарственное средство (ADC), содержащему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и низкомолекулярное лекарственное средство, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой любое из раскрытых здесь антител или их антигенсвязывающих фрагментов; предпочтительно, низкомолекулярное лекарственное средство представляет собой низкомолекулярное цитотоксическое лекарственное средство; и более предпочтительно, низкомолекулярное лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое лекарственное средство.

Химиотерапевтическое лекарственное средство может быть обычным химиотерапевтическим лекарственным средством против опухолей, таким как алкилирующий агент, антиметаболит, противоопухолевый антибиотик, противораковый агент растительного происхождения, гормон и иммунологический агент.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с низкомолекулярным лекарственным средством через линкер; линкер может представлять собой линкер, известный специалистам в данной области техники, например гидразоновая связь, дисульфидная связь или пептидная связь.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, где молярное отношение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к низкомолекулярному лекарственному средству составляет от 1:1 до 1:4, например, 1:1, 1:2, 1:3 или 1:4.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к биспецифичному антителу (также известному как бифункциональное антитело), содержащему первую функциональную область белка и вторую функциональную область белка, где:

первая функциональная область белка нацелена на IL-1 $\beta$ ,  
 вторая функциональная область белка нацелена на мишень, отличную от IL-1 $\beta$ , например, IL-17A;  
 где первая функциональная область белка представляет собой любое из раскрытых здесь антител или их антигенсвязывающих фрагментов;

предпочтительно, биспецифичное антитело находится в форме IgG-scFv;

предпочтительно:

(1) первая функциональная область белка представляет собой любое из раскрытых здесь антител или их антигенсвязывающих фрагментов, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело; или

(2) первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, его переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями

SEQ ID NO: 17-SEQ ID NO: 19, и его переменная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 20-SEQ ID NO: 22, а вторая функциональная область белка представляет собой антитело (например, моноклональное антитело).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к биспецифичному антителу, где первая функциональная область белка и вторая функциональная область белка связаны напрямую или через линкерный фрагмент;

предпочтительно, линкерный фрагмент представляет собой (GGGS)*m*, где *m* является положительным целым числом, таким как 1, 2, 3, 4, 5 или 6; или

предпочтительно, линкерный фрагмент представляет собой SS(GGGS)*n*, где *n* является положительным целым числом, таким как 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к биспецифичному антителу, где в пункте (2)

переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 14; и

переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к биспецифичному антителу, где в пункте (2)

переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, а переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4;

переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6, а переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8;

переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12; или

переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14, а переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к биспецифичному антителу, где количество функциональных областей первого белка и функциональных областей второго белка независимо равно 1, 2 или более.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к биспецифичному антителу, где в пункте (2) константная область моноклонального антитела выбрана из константных областей человеческого IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к биспецифичному антителу, где одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи антитела или моноклонального антитела.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела, и нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, где

переменная область тяжелой цепи антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 17-SEQ ID NO: 19, соответственно, а переменная область легкой цепи антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 20-SEQ ID NO: 22 соответственно;

предпочтительно, аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела выбрана из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 14, а аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела выбрана из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 16;

более предпочтительно, аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 2, а аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 4; аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 6, а аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 8; аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 10, а аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 12; или аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 14, а аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 16; и

еще более предпочтительно, чтобы выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержала

нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3,  
нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 7,  
нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11, или  
нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15.

Выделенная молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой одну молекулу нуклеиновой кислоты или несколько молекул нуклеиновой кислоты, например, две молекулы нуклеиновой кислоты. В случае одной молекулы нуклеиновой кислоты переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи антитела могут экспрессироваться одной и той же молекулой нуклеиновой кислоты, например, с помощью одинаковых или разных кассет экспрессии, расположенных на одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты. В случае нескольких молекул нуклеиновой кислоты, например, двух молекул нуклеиновой кислоты, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи антитела могут экспрессироваться различными молекулами нуклеиновой кислоты.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вектору, содержащему описанную здесь выделенную молекулу нуклеиновой кислоты. Число рекомбинантных векторов может составлять один или несколько. В случае множественных (например, двух) молекул нуклеиновых кислот, множественные (например, две) молекулы нуклеиновых кислот могут быть экспрессированы одним и тем же рекомбинантным вектором или разными рекомбинантными векторами.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей описанные здесь выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или рекомбинантный вектор.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения любого из раскрытых здесь антител или их антигенсвязывающих фрагментов, включающему в себя культивирование описанной здесь клетки-хозяина, в подходящих условиях и выделение из клеточных культур антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к линии гибридомных клеток LT010, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) под регистрационным номером CCTCC NO: C2018133.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей любое из раскрытых здесь антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытый здесь конъюгат антитело-лекарственное средство или раскрытое здесь биспецифичное антитело; необязательно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемые носители и/или вспомогательные вещества.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению любого из раскрытых здесь антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытого здесь конъюгата антитело-лекарственное средство или раскрытого здесь биспецифичного антитела при получении лекарственного средства для лечения и/или предотвращения аутоиммунных заболеваний, сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний, опухолей, криопирин-ассоциированных периодических синдромов у детей и взрослых, системного ювенильного идиопатического артрита или подагрического артрита;

предпочтительно, аутоиммунное заболевание выбрано из ревматоидного артрита, рассеянного склероза и синдромов периодической лихорадки;

предпочтительно, синдром периодической лихорадки выбран из периодического

синдрома, связанного с рецептором ФНО (TRAPS), синдрома гипер-IgD (HIDS)/дефицита мевалонаткиназы (MKD) и семейной средиземноморской лихорадки (FMF);

предпочтительно, криопирин-ассоциированный периодический синдром у детей и взрослых выбран из семейного холодового аутовоспалительного синдрома, синдрома Макла-Уэллса, мультисистемного воспалительного заболевания с неонатальным началом, хронического младенческого неврологического кожного и суставного синдрома и семейной холодовой крапивницы;

предпочтительно, сердечно-сосудистое и цереброваскулярное заболевание выбрано из инфаркта миокарда, атеросклероза, артериального тромбоза и церебрально-сосудистого нарушения;

предпочтительно, опухоль выбрана из рака легкого, гепатоцеллюлярной карциномы и острого миелоидного лейкоза; и

предпочтительно, подагрический артрит представляет собой острый подагрический артрит или хронический подагрический артрит.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению любого из раскрытых здесь антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытого здесь конъюгата антитело-лекарственное средство или раскрытого здесь биспецифичного антитела для получения

лекарственного средства для блокирования связывания человеческого IL-1 $\beta$  с человеческим IL-1R1 и/или человеческим IL-1R2,

лекарственного средства для подавления активности или снижения уровня человеческого IL-1 $\beta$ , или лекарственного средства для ингибирования активации последующих сигнальных путей, опосредованных связыванием человеческого IL-1 $\beta$  с человеческим IL-1R1 и/или человеческим IL-1R2.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения человеческий IL-1R1 и/или человеческий

IL-1R2 представляет собой человеческий IL-1R1 и/или человеческий IL-1R2 на поверхности клетки.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения применение является нетерапевтическим и/или недиагностическим.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения раскрытые здесь антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытый здесь конъюгат антитело-лекарственное средство или раскрытое здесь биспецифичное антитело предназначены для применения в лечении и/или предотвращении аутоиммунных заболеваний, сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний, опухолей, криопирин-ассоциированных периодических синдромов у детей и взрослых, ювенильного идиопатического артрита с системным началом или подагрического артрита;

предпочтительно, аутоиммунное заболевание выбрано из ревматоидного артрита, рассеянного склероза и синдромов периодической лихорадки;

предпочтительно, синдром периодической лихорадки выбран из периодического синдрома, связанного с рецептором ФНО (TRAPS), синдрома гипер-IgD (HIDS)/дефицита мевалонаткиназы (MKD) и семейной средиземноморской лихорадки (FMF);

предпочтительно, криопирин-ассоциированный периодический синдром у детей и взрослых выбран из семейного холодового аутовоспалительного синдрома, синдрома Макла-Уэллса, мультисистемного воспалительного заболевания с неонатальным началом, хронического младенческого неврологического кожного и суставного синдрома и семейной холодовой крапивницы;

предпочтительно, сердечно-сосудистое и цереброваскулярное заболевание выбрано из инфаркта миокарда, атеросклероза, артериального тромбоза и церебрально-сосудистого нарушения;

предпочтительно, опухоль выбрана из рака легкого, гепатоцеллюлярной карциномы и острого миелоидного лейкоза; и

предпочтительно, подагрический артрит представляет собой острый подагрический артрит или хронический подагрический артрит.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения раскрытые здесь антитело или антигенсвязывающий фрагмент, раскрытый здесь конъюгат антитело-лекарственное средство или раскрытое здесь биспецифичное антитело предназначены для применения в:

блокировании связывания человеческого IL-1 $\beta$  с человеческим IL-1R1 и/или человеческим IL-1R2, подавлении активности или снижении уровня человеческого IL-1 $\beta$ , или ингибировании активации последующих сигнальных путей, опосредованных связыванием человеческого IL-1 $\beta$  с человеческим IL-1R1 и/или человеческим IL-1R2.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения человеческий IL-1R1 и/или человеческий IL-1R2 представляет собой человеческий IL-1R1 и/или человеческий IL-1R2 на поверхности клетки.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу *in vivo* или *in vitro*, включающему в себя: введение в клетку эффективного количества любого из раскрытых здесь антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытого здесь конъюгата антитело-лекарственное средство или раскрытого здесь биспецифичного антитела, где способ выбран из

способа блокирования связывания человеческого IL-1 $\beta$  с человеческим IL-1R1 и/или человеческим IL-1R2, способа подавления активности или снижения уровня человеческого IL-1 $\beta$ , и способа ингибирования активации последующих сигнальных путей, опосредованной связыванием человеческого IL-1 $\beta$  с человеческим IL-1R1 и/или человеческим IL-1R2.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения человеческий IL-1R1 и/или человеческий IL-1R2 представляет собой человеческий IL-1R1 и/или человеческий IL-1R2 на поверхности клетки.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ *in vitro* является нетерапевтическим и/или недиагностическим.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения и/или предотвращения аутоиммунных заболеваний, сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний, опухолей, криопирин-ассоциированных периодических синдромов у детей и взрослых, системного ювенильного идиопатического артрита или подагрического артрита, включающему в себя: введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества любого из раскрытых здесь антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытого здесь конъюгата антитело-лекарственное средство или раскрытого здесь биспецифичного антитела;

предпочтительно, аутоиммунное заболевание выбрано из ревматоидного артрита, рассеянного склероза и синдромов периодической лихорадки;

предпочтительно, синдром периодической лихорадки выбран из периодического синдрома, связанного с рецептором ФНО (TRAPS), синдрома гипер-IgD (HIDS)/дефицита мевалонаткиназы (MKD) и семейной средиземноморской лихорадки (FMF);

предпочтительно, криопирин-ассоциированный периодический синдром у детей и взрослых выбран из семейного холодового аутовоспалительного синдрома, синдрома Макла-Уэллса, мультисистемного воспалительного заболевания с неонатальным началом, хронического младенческого неврологического кожного и суставного синдрома и семейной холодовой крапивницы;

предпочтительно, сердечно-сосудистое и цереброваскулярное заболевание выбрано из инфаркта миокарда, атеросклероза, артериального тромбоза и церебрально-сосудистого нарушения;

предпочтительно, опухоль выбрана из рака легкого, гепатоцеллюлярной карциномы и острого миелоидного лейкоза; и

предпочтительно, подагрический артрит представляет собой острый подагрический артрит или хронический подагрический артрит.

В ходе экспериментов на животных авторы настоящего изобретения обнаружили, что описанные здесь антитела, в частности 3Н6Н4L1, могут эффективно облегчать патологические изменения в модели ревматоидного артрита, индуцированного клетками NIH/3Т3, трансфицированными человеческим IL-1 $\beta$ , у мышей BALB/c, в частности, введение антитела 3Н6Н4L1 может эффективно облегчать патологическое поведение и уменьшать распухшую область пораженных конечностей у ревматоидных мышей.

В настоящем изобретении, если не указано иное, используемые здесь научные и технические термины имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области техники. Кроме того, лабораторные операции по культивированию клеток, молекулярной генетике, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, используемые в настоящем изобретении, являются рутинными операциями, широко используемыми в соответствующих областях техники. Между тем, чтобы лучше понять настоящее изобретение, ниже приведены определения и объяснения соответствующих терминов.

В контексте настоящего описания, когда речь идет об аминокислотной последовательности IL-1 $\beta$  (GenBank ID: NP000567.1), она включает в себя полноразмерный белок IL-1 $\beta$ , а также слитый белок IL-1 $\beta$ , такой как фрагмент, слитый с фрагментом белка Fc мышиноного или человеческого IgG (mFc или hFc) или множественными остатками His. Однако специалистам в данной области техники понятно, что в аминокислотной последовательности IL-1 $\beta$  мутации или вариации (включая без ограничений замены делеции и/или вставки) могут возникать естественным путем или искусственно вводиться без влияния на их биологические функции. Таким образом, в настоящем изобретении термин "IL-1 $\beta$ " включает в себя все такие последовательности, а также их естественные или искусственные варианты. Кроме того, когда описывается фрагмент последовательности белка IL-1 $\beta$ , он включает в себя фрагмент последовательности IL-1 $\beta$ , а также соответствующие фрагменты последовательности в его естественных или искусственных вариантах.

В данном контексте, когда речь идет об аминокислотной последовательности IL-1R1 (GenBank ID: NP000868), она включает в себя полноразмерный белок IL-1R1, а также слитый белок IL-1R1, такой как фрагмент слитый с фрагментом белка Fc мышиноного или человеческого IgG (mFc или hFc) или множественными остатками His. Однако специалистам в данной области техники понятно, что в аминокислотной последовательности белка IL-1R1 мутации или вариации (включая без ограничений замены, делеции и/или вставки) могут возникать естественным образом или искусственно вводиться без влияния на их биологические функции. Таким образом, в настоящем изобретении термин "IL-1R1" включает в себя все такие последовательности, а также их естественные или искусственные варианты. Кроме того, когда описывается фрагмент последовательности белка IL-1R1, он включает в себя фрагмент последовательности IL-1R1, а также соответствующие фрагменты последовательности в его естественных или искусственных вариантах.

В данном контексте, когда речь идет об аминокислотной последовательности IL-1R2 (GenBank ID: CAA42441.1), она включает в себя полноразмерный белок IL-1R2, а также слитый белок IL-1R2, такой как фрагмент, слитый с фрагментом белка Fc мышиноного или человеческого IgG (mFc или hFc) или множественными остатками His. Однако специалистам в данной области техники понятно, что в аминокислотной последовательности белка IL-1R2 мутации или вариации (включая без ограничения замены, делеции и/или вставки) могут возникать естественным образом или искусственно вводиться без влияния на их биологические функции. Таким образом, в настоящем изобретении термин "IL-1R2" включает в себя все такие последовательности, а также их естественные или искусственные варианты. Кроме того, когда описывается фрагмент последовательности белка IL-1R2, он включает в себя фрагмент последовательности IL-1R2, а также соответствующие фрагменты последовательности в его естественных или искусственных вариантах.

Используемый здесь термин "EC<sub>50</sub>" относится к концентрации для 50% максимального эффекта, то есть концентрации, которая может вызвать 50% максимального эффекта.

Используемый здесь термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух пар полипептидных цепей (каждая пара с одной "легкой" (L) цепью и одной "тяжелой" (H) цепью). Легкие цепи антитела классифицируются как легкие цепи  $\kappa$  и  $\lambda$ . Тяжелые цепи классифицируются как  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  или  $\epsilon$ . А изоотипы антител определяются как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В легких цепях и тяжелых цепях переменная область и константная область связаны областью "J" из примерно 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь также включает в себя область "D" из примерно 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи

(CL). Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулинов с тканями или факторами хозяина, включая связывание различных клеток иммунной системы (например, эффекторных клеток) с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Области VH и VL можно дополнительно подразделить на гипервариабельные области (называемые определяющими комплементарность областями или CDR), между которыми распределены консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от аминоконца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области (VH и VL) каждой пары тяжелая цепь/легкая цепь образуют сайт связывания антитела соответственно. Отнесение аминокислот к каждой области или домену осуществляется по определению в Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 и 1991)), Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, or Chothia et al. (1989) *Nature* 342:878-883. Термин "антитело" не ограничивается каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, антитело включает в себя, в частности, рекомбинантное антитело, моноклональное антитело и поликлональное антитело. Антитела могут быть разных изотипов, например, антитела IgG (например, подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

Используемый здесь термин "антигенсвязывающий фрагмент", также известный как "антигенсвязывающая часть", относится к полипептиду, содержащему фрагмент полноразмерного антитела, который сохраняет способность специфично связываться с тем же антигеном, с которым связывается полноразмерное антитело, и/или конкурирует с полноразмерным антителом за специфичное связывание с антигеном. Для общей информации см. *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989)), которая полностью включена в настоящее изобретение путем ссылки для всех целей. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен при помощи технологий рекомбинантных ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент включает в себя Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb и фрагмент определяющей комплементарности области (CDR), одноцепочечное антитело, (например, scFv), химерное антитело, диатело и полипептид, которые содержат, по меньшей мере, часть антитела, достаточную для придания полипептиду специфичной антигенсвязывающей способности.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой одноцепочечное антитело (например, scFv), в котором домены VL и VH спарены с образованием одновалентной молекулы через линкер, который позволяет им образовывать единую полипептидную цепь (см., например, Bird et al., *Science* 242: 423-426 (1988) и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883 (1988)). Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру: NH<sub>2</sub>-VL-линкер-VH-COOH или NH<sub>2</sub>-VH-линкер-VL-COOH. Подходящий линкер предшествующего уровня техники состоит из повторяющейся аминокислотной последовательности GGGGS или ее варианта. Например, может использоваться линкер, имеющий аминокислотную последовательность (GGGGS)<sub>4</sub>, но также можно использовать его вариант (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448). Другие линкеры, которые можно использовать в настоящем изобретении, описаны Alfthan et al. (1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi et al. (2001), *Eur. J. Immunol.* 31: 94-106, Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 и Roovers et al. (2001), *Cancer Immunol.*

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой диатело, то есть двухвалентное антитело, в котором домены VH и VL экспрессируются в одной полипептидной цепи. Однако используемый линкер слишком короткий, чтобы позволить спаривание двух доменов в одной цепи, поэтому домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами на другой цепи, и создаются два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448(1993), и Poljak R.J. et al., *Structure* 2:1121-1123 (1994)).

В других случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой "бифункциональное антитело". Бифункциональное антитело, также известное как биспецифичное антитело, представляет собой специфичное лекарственное средство, которое одновременно нацелено на два разных антигена, и может быть получено путем иммуноселективной очистки. Кроме того, биспецифичное антитело также можно получить с помощью генной инженерии, которая имеет определенные преимущества благодаря соответствующей гибкости в таких аспектах, как оптимизация сайтов связывания, получение синтетической формы и выхода. В настоящее время показано, что биспецифичные антитела существуют в более чем 45 формах (Muller D., Kontermann R.E. *Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives.* *BioDrugs* 2010; 24:89-98). Был разработан ряд биспецифичных антител в форме IgG-ScFv, а именно в форме Моррисона (1997 Coloma M.J., Morrison S.L. *Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies.* *Nature Biotechnology*, 1997; 15:159-163), для которой было показано, что она является одной из идеальных форм биспецифичных антител, благодаря своему сходству с естественно существующей формой IgG и преимуществ в инженерии, экспрессии и очистке антител (Miller B.R., Demarest S.J., et al., *Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies.* *Protein Eng Des Sel* 2010; 23:549-57; Fitzgerald J., Lugovskoy A. *Rational engineering of antibody therapeutics targeting multiple oncogene pathways.* *MAbs* 2011; 3:299-309).

Антигенсвязывающие фрагменты антител (например, описанные выше фрагменты антител) могут быть получены из данного антитела (например, из описанного здесь моноклонального антитела 3Н6, 3Н6Н1L1, 3Н6Н2L2, 3Н6Н3L3 или 3Н6Н4L1) с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области техники (например, технологии рекомбинантных ДНК или ферментативного или химического расщепления), и антигенсвязывающие фрагменты антител проверяются на специфичность таким же образом, как и в случае интактных антител.

Используемые здесь термины "mAb" и "моноклональное антитело" относятся к антителу или фрагменту антитела, которое получено из группы высокомолекулярных антител, то есть из группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут происходить спонтанно. Моноклональное антитело обладает высокой специфичностью в отношении одного эпитопа на антигене. Поликлональное антитело по сравнению с моноклональным антителом обычно включает в себя, по меньшей мере, два или более разных антитела, которые обычно распознают разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела обычно можно получить с использованием гибридомного метода, впервые описанного Kohler et al. (*Nature*, 256: 495, 1975), но также могут быть получены с использованием технологий рекомбинантных ДНК (см., например, патент США No.4816567).

Используемый здесь термин "гуманизованное антитело" относится к антителу или фрагменту антитела, полученному, когда все или часть участков CDR человеческого иммуноглобулина (рецепторного антитела) заменены участками CDR нечеловеческого антитела (донорское антитело), где донорское антитело может быть нечеловеческим (например, мышинным, крысиным или кроличьим) антителом, имеющим ожидаемую специфичность, аффинность или реактивность. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) рецепторного антитела также могут быть заменены аминокислотными остатками соответствующих нечеловеческих антител или аминокислотными остатками других антител для дальнейшего улучшения или оптимизации работы антитела. Подробнее о гуманизованных антителах см., например, в Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); и Clark, *Immunol. Today* 21: 397-402 (2000).

Используемый здесь термин "выделенный" относится к объектам, полученным искусственным путем из естественного состояния. Если в природе появляется определенное "выделенное" вещество или компонент, то это может быть связано с изменением в его естественной среде, или с тем, что оно выделено от окружающей среды, или и то, и другое. Например, определенный невыделенный полинуклеотид или полипептид в природе существует в определенном живом животном, и тот же полинуклеотид или полипептид, выделенный с высокой чистотой, из такого естественного состояния, называется выделенным полинуклеотидом или полипептидом. Термин "выделенный" не исключает присутствие искусственных или синтетических веществ или других примесей, которые не влияют на активность вещества.

Используемый здесь термин "вектор" относится к носителю нуклеиновой кислоты, в который может быть вставлен полинуклеотид. Когда вектор позволяет экспрессию белка, кодируемого вставленным полинуклеотидом, вектор называется экспрессионным вектором. Вектор может быть введен в клетку-хозяин путем трансформации, трансдукции или трансфекции, так что элементы генетического вещества, переносимые вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области техники, включая, без ограничений плазмиды; фагемиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы дрожжей (YAC), бактериальные искусственные хромосомы (BAC) или искусственные хромосомы на основе P1 (PAC); фаги, такие как лямбда-фаги или фаги M13, и вирусы животных. Вирусы животных, которые могут использоваться в качестве векторов, включают в себя без ограничений ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, вирусы папилломы и паповавирусы (такие как SV40). Вектор может содержать множество элементов, которые контролируют экспрессию, включая без ограничения промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы отбора и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать сайт инициации репликации.

Используемый здесь термин "клетка-хозяин" относится к клеткам, которые можно использовать для введения векторов, включая без ограничений прокариотические клетки, такие как *E. coli* или *B. subtilis*, клетки грибов, такие как клетки дрожжей или *aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или клетки животных, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки НЕК 293 или клетки человека.

Используемый здесь термин "биспецифичный", "с двойной специфичностью" или "бифункциональный" антигенсвязывающий белок или антитело представляет собой гибридный антигенсвязывающий белок или антитело, имеющий два разных антигенсвязывающих сайта соответственно. Биспецифичное антитело представляет собой мультиспецифичный антигенсвязывающий белок или мультиспецифичное антитело, и его можно получить множеством способов, включая без ограничений слияние гибридом или связывание фрагментов Fab'; см., например, Songsivilai and Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321; Kostelny et al. 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553. Два сайта связывания биспецифичного антигенсвязывающего белка или антитела будут связывать два разных эпитопа, которые присутствуют в одинаковых или разных белках-мишенях.

Используемый здесь термин "специфично связываться" относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, такой как реакция между антителом и антигеном, на который оно нацелено. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин "антитело, которое специфично связывается с антигеном" (или антитело, которое специфично для антигена), означает, что антитело связывается с антигеном с аффинностью ( $K_D$ ) менее примерно  $10^{-5}$  М, например, менее примерно  $10^{-6}$  М, менее примерно  $10^{-7}$  М, менее примерно  $10^{-8}$  М, менее примерно  $10^{-9}$  М или менее примерно  $10^{-10}$  М или меньше.

Используемый здесь термин " $K_D$ " относится к константе равновесия диссоциации для специфичного взаимодействия антитело-антиген, которая используется для описания аффинности связывания между антителом и антигеном. Чем меньше константа равновесной диссоциации, тем плотнее связывание антитело-антиген и тем выше сродство между антителом и антигеном. Обычно антитело (например, описанное здесь моноклональное антитело 3Н6, 3Н6Н1L1, 3Н6Н2L2 или 3Н6Н3L3) связывается с антигеном (например, белком IL-1 $\beta$ ) с константой равновесия диссоциации ( $K_D$ ) менее примерно  $10^{-5}$  М, например, менее примерно  $10^{-6}$  М, менее примерно  $10^{-7}$  М, менее примерно  $10^{-8}$  М, менее примерно  $10^{-9}$  М или менее примерно  $10^{-10}$  М или меньше.  $K_D$  можно определить с использованием методов, известных специалистам в данной области техники, например, с использованием прибора для измерения молекулярного взаимодействия Biacore.

Используемые здесь термины "моноклональное антитело" и "mAb" имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины "поликлональное антитело" и "PcAb" имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины "полипептид" и "белок" имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо. В настоящем изобретении аминокислоты обычно обозначены однобуквенными и трехбуквенными сокращениями, известными в данной области техники. Например, аланин может быть обозначен буквой А или Ala.

В контексте настоящего описания термины "гибридома" и "линия гибридных клеток" могут использоваться взаимозаменяемо, и когда они относятся к терминам "гибридома" и "линия гибридных клеток", они также включают в себя субклоны и клетки-потомки гибридомы. Например, когда речь идет о линии гибридных клеток LT010, это также относится к субклонам и клеткам-потомкам линии гибридных клеток LT010.

Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество" относится к носителю и/или вспомогательному веществу, который фармакологически и/или физиологически совместим с субъектом и активным ингредиентом, который хорошо известен в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro A.R., 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995) и включает в себя без ограничений регуляторы значения pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты и усилители ионной силы. Например, регуляторы значения pH включают в себя без ограничений фосфатный буфер; поверхностно-активные вещества включают в себя без ограничений катионные, анионные или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Твин-80; и усилители ионной силы включают в себя без ограничений хлорид натрия.

Используемый здесь термин "эффективное количество" относится к количеству, достаточному для получения или, по меньшей мере, частичного получения желаемого эффекта. Например, термин "профилактически (например, в случае РА) эффективное количество" относится к количеству, достаточному для предотвращения, остановки или отсрочки возникновения заболеваний (например, РА); Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, достаточному для излечения или, по меньшей мере, частичной остановки заболевания и его осложнений у пациентов, страдающих этим заболеванием. Специалисты в данной области техники вполне могут определить такое эффективное количество. Например, количество, эффективное для терапевтического применения, будет зависеть от тяжести заболевания, которое необходимо лечить, общего состояния собственной иммунной системы пациента, общего состояния пациента, такого как возраст, вес и пол, способа введения лекарственного средства и других видов лечения, применяемым одновременно, и т.д.

Преимущества изобретения.

Раскрытое здесь анти-IL-1 $\beta$  антитело, в частности гуманизированное анти-IL-1 $\beta$  антитело, обладает одним или несколькими из следующих технических эффектов:

- (1) эффективное связывание с человеческим IL-1 $\beta$  и блокирование связывания IL-1 $\beta$  с его рецептором IL-1R1;
- (2) ингибирование активации последующего пути передачи сигнала IL-1 $\beta$ ;
- (3) способность специфично ингибировать активность IL-1 $\beta$  в отношении индуцирования секреции IL-6 клетками MRC-5;
- (4) способность эффективно блокировать способность IL-1 $\beta$  к активации NF- $\kappa$ B;
- (5) возможность применения для получения лекарственного средства для ингибирования IL-1 $\beta$ ; и
- (6) возможность применения для получения лекарственного средства для предотвращения и/или лечения таких заболеваний, как ревматоидный артрит, подагра, рассеянный склероз, сердечно-сосудистые события и/или сердечно-сосудистые заболевания, опухоли, криопирин-ассоциированные периодические синдромы у детей и взрослых, синдромы периодической лихорадки, системный ювенильный идиопатический артрит.

### Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - результаты анализа активности связывания ЗН6, ЗН6Н1Л1, ЗН6Н2Л2 и ЗН6Н3Л3 с человеческим IL-1 $\beta$ -His-Bio.

Фиг. 2 - результаты анализа активности связывания ЗН6Н4Л1 с человеческим IL-1 $\beta$ -His-Bio.

Фиг. 3 - результаты анализа активности ЗН6, ЗН6Н1Л1, ЗН6Н2Л2 и ЗН6Н3Л3, конкурирующих с человеческим IL-1R1(1-332)-His за связывание с человеческим IL-1 $\beta$ -hFc.

Фиг. 4 - результаты анализа активности ЗН6Н4Л1, конкурирующего с человеческим IL-1R1(1-332)-His, за связывание с человеческим IL-1 $\beta$ -hFc.

Фиг. 5 - результаты анализа константы сродства ЗН6Н4Л1 к человеческому IL-1 $\beta$ . Примечание: кривые 1-5 показывают концентрации аналита при 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ, 3,13 нМ и 1,56 нМ соответственно.

Фиг. 6 - результаты анализа константы сродства канакинумаба к человеческому IL-1 $\beta$ . Примечание: кривые 1-5 показывают концентрации аналита при 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ, 3,13 нМ и 1,56 нМ соответственно.

Фиг. 7 - влияние ЗН6Н4Л1 на IL-1 $\beta$ -индуцированную секрецию IL-6 посредством клетками MRC-5.

Фиг. 8 - влияние IL-1 $\beta$  на градиентную активацию сигнального пути NF- $\kappa$ B.

Фиг. 9 - диаграмма репортерного анализа ЗН6Н4Л1, блокирующего IL-1 $\beta$ .

Фиг. 10 - влияние ЗН6Н4Л1 на патологическое поведение в мышинной модели коленного артрита, индуцированного Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3.

Фиг. 11 - влияние ЗН6Н4Л1 на область коленного сустава в мышинной модели коленного артрита, индуцированного Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3.

Фиг. 12 - влияние ЗН6Н4Л1 на массу тела в мышинной модели коленного артрита, индуцированного Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3.

### Подробное описание изобретения

Варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на примеры. Специалистам в данной области техники будет понятно, что следующие примеры используются только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Случаи без конкретных описаний методов или условий были выполнены в соответствии с методами или условиями, описанными в литературе в данной области техники (например, см. Guide to Molecular Cloning Experiments, authored by J. Sambrook et al., and translated by Huang Peitang et al., third edition, Science Press) или в соответствии с инструкцией производителя к продукту. Используемые реагенты или инструменты являются коммерчески доступными обычными продуктами, если их производители не указаны.

В следующих примерах настоящего изобретения использованные мыши линии BALB/c были приобретены в Центре медицинских экспериментальных животных провинции Гуандун.

В следующих примерах настоящего изобретения коммерчески доступное антитело канакинумаб для той же мишени (торговое наименование Daris®) было приобретено у фирмы Novartis и использовалось в качестве контрольного антитела.

Пример получения 1. Получение слитых белков IL-1 $\beta$ -His человека, IL-1R1(1-332)-His, IL-1 $\beta$ -hFc и IL-1 $\beta$ -His-Bio человека.

Белковые последовательности человеческого IL-1 $\beta$  (регистрационный номер в Genbank: NP000567.1) и IL-1R1 (регистрационный номер в Genbank: NP\_000868) были найдены в базе данных белков NCBI GenBank. Аминокислотные последовательности IL-1 $\beta$  и IL-1R1 человека были слиты с последовательностями метки His и метки очистки Fc IgG человека, соответственно, и получили сокращенные названия IL-1 $\beta$ -His человека, IL-1R1(1-332)-His, IL-1 $\beta$ -hFc соответственно.

Качество образцов белка оценивали с помощью ДСН-ПААГ.

Образцы биотинилированного человеческого белка IL-1 $\beta$ -His (для краткости называемого человеческий IL-1 $\beta$ -His-Bio) были приготовлены с использованием набора реагентов EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit (Thermo Scientific) и конкретный процесс получения проводили в соответствии с инструкцией к этому набору реагентов.

Полученные слитые белки использовали в следующих примерах.

Пример 1. Получение мышинового анти-IL-1 $\beta$  антитела ЗН6.

1. Получение гибридной клеточной линии LT010.

Мышей линии BALB/c (приобретенных в Центре медицинских лабораторных животных Гуандуна) иммунизировали человеческим IL-1 $\beta$ -his в качестве антигена, и клетки селезенки иммунизированных мышей сливали с клетками миеломы мыши с образованием гибридных клеток. Гибридные клетки подвергали скринингу с использованием IL-1 $\beta$ -His-Bio в качестве антигена с помощью твердофазного ИФА, чтобы получить гибридные клетки, способные секретировать антитело, специфично связывающееся с IL-1 $\beta$ -His-Bio. Полученные с помощью твердофазного ИФА гибридные клетки подвергали скринингу с помощью конкурентного твердофазного ИФА, чтобы получить гибридные клетки, способные секретировать антитело, которое конкурирует с

рецептором IL-1R1(1-332)-His за связывание с IL-1 $\beta$ -hFc, и стабильную линию гибридных клеток получали путем предельного разведения. Способы получения гибридных клеток относятся к общепринятым в настоящее время методам (например, Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000).

Авторы настоящего изобретения обозначили указанную выше линию гибридных клеток линией гибридных клеток LT010 (IL-1 $\beta$ -3H6) и назвали секретируемое ею моноклональное антитело 3H6.

Линия гибридных клеток LT010 (IL-1 $\beta$ -3H6) была депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) 21 июня 2018 г. под регистрационным номером ССТСС NO: C2018133 и адресом хранения Уханьского университета, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

## 2. Получение анти-IL-1 $\beta$ антитела 3H6.

Полученную выше клеточную линию LT010 культивировали в гибридной бессывороточной среде, (бессывороточная гибридная среда, содержащая 1% пенициллин-стрептомицин и 4% глутамакс, культивированная в инкубаторе клеток при температуре 37°C с 5% CO<sub>2</sub>). Через 7 дней супернатант клеточной культуры собирали и подвергали высокоскоростному центрифугированию, вакуумной фильтрации через микрофильтрационную мембрану и очистке через колонку HiTrap с белком А НР с получением антитела 3H6. Очищенные образцы 3H6 оценивали при помощи электрофореза в ДСН-ПААГ.

Пример 2. Анализ последовательности анти-IL-1 $\beta$  антитела 3H6.

мРНК экстрагировали из клеточной линии LT010, культивируемой в примере 1, в соответствии с методом набора реагентов для экстракции общей бактериальной РНК из культивируемых клеток (Tian-gen, каталожный номер DP430). кДНК синтезировали в соответствии с руководством к набору реагентов Invitrogen Superscript III First-Strand Synthesis System для ОТ-ПЦР и амплифицировали с помощью ПНР. Продукты, амплифицированные с помощью ПЦР, сразу подвергали процедуре ТА-клонирования, и конкретные операции выполняли в соответствии с инструкцией к набору реагентов pEASY-T1 Cloning Kit (Transgen CT101).

Продукты ТА-клонирования подвергали прямому секвенированию, и результаты секвенирования были следующими.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную область тяжелой цепи антитела 3H6: (354 п.н.)

CAGGTGACCCTGAAGGAGAGCGGACCAGGAATCCTGCAGCCTAGCCAGACA  
CTGAGCCTGACTTGCAGCTTCAGCGGCTTCAGCCTGAGCACAAGCGGAATGGGCGT  
GTCTTGGATCAGGCAGCCATCAGGAAAGGGACTCGAGTGGCTGGCTCACATCTACT  
GGGACGACGACAAGCGGTACAACCCCTCCCTGAAGAGCAGGCTGACCATCAGCAAG  
GACACCAGCAGCAACCAGGTGTTCTGAAGATCACCAGCGTGGACACCGCCGATAG  
CGCTACCTACTATTGCGCCAGAAGCGCCTACTACAGCTTCGCCTATTGGGGCCAGGG  
AACACTGGTGTCCGTGTCAGCC (SEQ ID NO: 1)

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 3H6 является следующей: (118 аминокислотных остатков, в которых подчеркнутые аминокислотные последовательности являются областями CDR)

QVTLKESGPGILQPSQTL~~SL~~TCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYW  
DDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADSATYYCARSAYYSFAYWGQGLV  
SVSA (SEQ ID NO: 2)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную область легкой цепи антитела 3H6: (318 п.н.)

GATATCGTCATGACACAGTACATAAGTTTATGTCTACTAGTGTGGGCGGGC  
GGGTGAGAATTACCTGTAAGGCCTCTCAGGACGTGGATACAGACGTGGCTTGGTTCC  
AGCAGAAGCCCGGACAGAGCCCTAAACTGCTGATCTACTGGCCTCCACAAGGCAC  
ACTGGGGTGCCAGATCGGTTCACTGGATCAGGCAGCGGGACCGACTTTACTCTGACC  
ATTTCCAACGTCCAGTCTGAGGATCTGGCTGACTATTTCTGCCAGCAGTACAGCTCC  
TATCCACCTTTGGAGCAGGCACAAAGCTGGAACTGAAA (SEQ ID NO: 3)

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 3H6 является следующей: (106 аминокислотных остатков, в которых подчеркнутые аминокислотные последовательности являются областями CDR)

DIVMTQSHKFMSTSVGGRVRITCKASQDVDTDVAWFQQKPGQSPKLLIYWASTR  
HTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQYSSYPTFGAGTKLELK (SEQ ID  
NO: 4)

Пример 3. Дизайн и получение гуманизированных анти-IL-1 $\beta$  антител против 3H6H1L1, 3H6H2L2, 3H6H3L3 и 3H6H4L1.

1. Дизайн последовательностей легкой и тяжелой цепей гуманизированных анти-IL-1 $\beta$  3H6H1L1, 3H6H2L2, 3H6H3L3 и 3H6H4L1.

На основе трехмерной кристаллической структуры белка IL-1 $\beta$  (van Oostrum J., Priestle J.P., Grütter M.G., Schmitz A. The structure of murine interleukin-1 beta at 2.8 Å resolution. J Struct Biol. 1991, 107(2): 189-95.) И последовательности, полученной в примере 2, были сконструированы последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител 3H6H1L1, 3H6H2L2, 3H6H3L3 и 3H6H4L1 (последовательности константных областей антител 3H6H1L1, 3H6H2L2 и 3H6H3L3 взяты из базы данных NCBI, где константная область тяжелой цепи представляет собой С-область гамма-1 цепи Ig, Регистрационный номер: P01857, а константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, Регистрационный номер: P01834; последовательности константных областей антитела 3H6H4L1 взяты из базы данных NCBI, где константная область тяжелой цепи представляет собой С-область гамма-4 Ig, Регистрационный номер: P01861.1, а константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, Регистрационный номер: P01834).

Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител 3H6H1L1, 3H6H2L2, 3H6H3L3 и 3H6H4L1 были следующими.

(1) Гуманизированное моноклональное антитело 3H6H1L1.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи антитела 3H6H1L1: (354 п.н.)

CAGGTGACACTGAAGGAGTCTGGCCCCGCCCTGCTGAAGCCTACCCAGACAC  
TGACCCTGACATGTACCTTCTCCGGCTTTTCTCTGAGCACCTCCGGCATGGGCGTGTG  
TTGGATCAGGCAGCCAAGCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCACACATCTACTGGG  
ACGATGACAAGCGGTATAACCCCTCCCTGAAGTCTAGACTGACAATCTCTAAGGAT  
ACCAGCTCCAACCAGGTGTTCCCTGAAGATCACAATGTGGATACCGTGGACACAGC  
CACCTACTATTGCGCCCGGAGCGCCTACTATTCCTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCAC  
ACTGGTGTCTGTGAGCGCC (SEQ ID NO: 5)

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела 3H6H1L1 является следующей: (118 аминокислотных остатков, в которых подчеркнутые аминокислотные последовательности представляют собой участки CDR)

QVTLKESGPALLKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKALEWLAHIYW  
DDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITNVDTVDTATYYCARSAYYSFAYWGQGLV  
SVSA (SEQ ID NO: 6)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи антитела 3H6H1L1: (318 п.н.)

GATATCCAGATGACCCAGTCCCACAGCTCCATGTCCACATCTGTGGGCGACC  
GGGTGAGAATCACCTGTTCGGCCCTCCAGGACGTGGATACAGACGTGGCCCTGGTTT  
CAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGGCA  
CTCCGGAGTGCCATCTCGCTTCAGCGGCTCCGGCTCTGGCACAGACTTCACCCTGAC  
AATCAGCAACGTGCAGCCAGAGGATTCGCCGACTACTATTGCCAGCAGTACTCTAG  
CTATCCCACCTTTGGCGCCGGCACAAAGCTGGAGCTGAAG (SEQ ID NO: 7)

Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела 3H6H1L1 является следующей: (106 аминокислотных остатков, в которых подчеркнутые аминокислотные последовательности представляют собой участки CDR)

DIQMTQSHSSMSTSVGDRVRITCRASQDVDTDVAVWFQKPGQAPKLLIYWASTR  
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISNVQPEDFADYYCQYSSYPTFGAGTKLELK (SEQ ID  
NO: 8)

(2) Гуманизированное моноклональное антитело 3H6H2L2.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную область тяжелой цепи антитела 3H6H2L2: (354 п.н.)

CAGGTGACACTGAAGGAGTCCGGCCCCGCCCTGGTGAAGCCTACCCAGACAC  
TGACCCTGACATGTACCTTCAGCGGCTTTTCTCTGAGCACCTCCGGCATGGGCGTGT  
CCTGGATCAGGCAGCCATCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCCACATCTACTGG  
GACGATGACAAGCGGTATTCTCCCAGCCTGAAGTCTAGACTGACAATCAGCAAGGA  
TACCAGCTCCAACCAGGTGTTCCCTGACAATCACCAACGTGGACCCCGTGGACACAG  
CCACCTACTATTGCGCCCCGAGCGCCTACTATTCCTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCA  
CACTGGTGTCCGTGTCTGCC (SEQ ID NO: 9)

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 3H6H2L2 является следующей: (118 аминокислотных остатков, в которых подчеркнутые аминокислотные последовательности являются областями CDR)

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKALEWLAHIYW  
DDDKRYSPLKSRITISKDTSSNQVFLTITNVDPVDTATYYCARSAYYSFAIYWGQGLV  
SVSA (SEQ ID NO: 10)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную область легкой цепи антитела 3H6H2L2: (318 п.н.)

GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGACC  
GGGTGAGAATCACCTGTAGGGCCTCTCAGGACGTGGATACAGACGTGGCCTGGTAC  
CAGCAGAAGCCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCCTCTACCCTGCAG  
AGCGGAGTGCCATCCCGTTCTCTGGCAGCGGCTCCGGAACAGACTTCACCCTGACA  
ATCTCTAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACTCCTCT  
TATCCACCTTTGGCGCCGGCACAAAGCTGGAGCTGAAG (SEQ ID NO: 11)

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 3H6H2L2 является следующей: (106 аминокислотных остатков, в которых подчеркнутые аминокислотные последовательности представляют собой участки CDR)

DIQMTQSPSSLSASVGDTRITCRASQDVDTDVAWYQQKPKAPKLLIYWASTL  
QSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLPEDFATYYCQYSSYPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:  
12)

(3) Гуманизированное моноклональное антитело 3H6H3L3.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную область тяжелой цепи антитела 3H6H3L3: (354 п.н.)

CAGGTGACACTGAAGGAGAGCGGCCAGCCCTGGTGAAGCCAACCCAGACA  
CTGACCCTGACATGTACCTTCTCCGGCTTTAGCCTGTCCACCTCTGGCATGGGCGTGT  
CTTGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCCTGATCTACTGG  
GACGATGACAAGCGGTATAGCCCTTCCCTGAAGAGCAGACTGACAATCTCCAAGGA  
TACCTTAAGAACCAGGTGGTGTGACAATCACCAACGTGGACCCCGTGGACACAG  
CCACCTACTATTGCGCCCCGAGCGCCTACTATTCCTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCA  
CACTGGTGTCTGTGAGCGCC (SEQ ID NO: 13)

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 3H6H3L3 является следующей: (118 аминокислотных остатков, в которых подчеркнутые аминокислотные последовательности являются областями CDR)

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLALIYW  
DDDKRYSPLKSRITISKDTSKNQVFLTITNVDPVDTATYYCARSAYYSFAIYWGQGLV  
SVSA (SEQ ID NO: 14)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область легкой цепи антитела 3H6H3L3: (318 п.н.)

GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGACA  
GGGTGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGGACGTGGATACCGACCTGGCCTGGTAC  
CAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCCTCTACCCTGCAG  
AGCGGAGTGCCATCCCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCCGGAACAGACTTCACCCTGACA  
ATCTCTAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACTCCTCT  
TATCCCACCTTTGGCGCCGGCACAAAGCTGGAGCTGAAG (SEQ ID NO: 15)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела 3H6H3L3 является следующей: (106 аминокислотных остатков, в которых подчеркнутые аминокислотные последовательности являются областями CDR)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVDTDLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTL  
QSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLPEDFATYYCQOYSSYPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:

16)

(4) Гуманизованное моноклональное антитело 3H6H4L1.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи антитела 3H6H4L1, представлена в SEQ ID NO: 5.

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 3H6H4L1 представлена в SEQ ID NO: 6.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область легкой цепи антитела 3H6H4L1, представлена в SEQ ID NO: 7.

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела 3H6H4L1 представлена в SEQ ID NO: 8.

2. Получение гуманизованных антител 3H6H1L1, 3H6H2L2, 3H6H3L3 и 3H6H4L1.

Константные области тяжелой цепи 3H6H1L1, 3H6H2L2 и 3H6H3L3 представляют собой С-область цепи гамма-1 Ig, Регистрационный номер: P01857; и константные области легкой цепи представляют собой С-область каппа-цепи Ig, Регистрационный номер: P01834;

константная область тяжелой цепи 3H6H4L1 представляет собой С-область цепи гамма-4 Ig, Регистрационный номер: P01861.1; а константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, Регистрационный номер: P01834.

Каждую из кДНК тяжелой и легкой цепей 3H6H1L1, 3H6H2L2, 3H6H3L3 и 3H6H4L1 клонировали в вектор pUC57simple (предоставленный Genscript) с получением 8 рекомбинантных плазмид соответственно, а именно pUC57simple-3H6H1 и pUC57Limple-3H6Simple; pUC57simple-3H6H2 и pUC57simple-3H6L2; pUC57simple-3H6H3 и pUC57simple-3H6L3; и pUC57simple-3H6H4 и pUC57simple-3H6L1, и субклонировали их в векторы pcDNA3.1 соответственно. Рекомбинантные плазмиды, содержащие тяжелую цепь, и рекомбинантные плазмиды, содержащие легкую цепь, котрансфицировали в клетки 293F, затем культуру клеток собирали и очищали с получением гуманизованных антител 3H6H1L1, 3H6H2L2, 3H6H3L3 и 3H6H4L1. Результаты оценивали с помощью ДСН-ПААГ.

Пример 4. Анализ активности связывания антител 3H6, 3H6H1L1, 3H6H2L2, 3H6H3L3 и 3H6H4L1 с человеческим IL-1 $\beta$ -His-Bio (ИФА).

Планшет покрывали 50 мкл 2 мкг/мл SA (стрептавидина) в каждую лунку и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. После однократной промывки планшета и удаления остаточной жидкости каждую лунку блокировали 300 мкл 1% раствора БСА (растворенного в ФСБ) и планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 2 часов. Планшет промывали трижды и удаляли остаточную жидкость. Человеческий IL-1 $\beta$ -His-Bio в каждой лунке разбавляли 50 мкл ФСБТ до 0,2 мкг/мл, и планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. Затем планшет промывали трижды и удаляли остаточную жидкость. Антитело разбавляли до 1 мкг/мл (результаты в табл. 1) или до 0,333 мкг/мл (результаты в табл. 2) в качестве начальной концентрации, и проводили градиентное разбавление 1:3 для получения в общей сложности 7 концентраций в дополнение к пустому контролю. Указанные выше концентрации тестировали в двух дублирующих лунках с конечным объемом 100 мкл на лунку, и планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. После трехкратной промывки планшета и похлопывания для удаления остатков жидкости в каждую лунку добавляли 50 мкл рабочего раствора вторичного антитела козьих антител против человеческого IgG (H+L), меченных пероксидазой хрена, или рабочего раствора вторичного антитела козьих антител против мышинового IgG (H+L), меченных пероксидазой хрена, и планшет инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C, затем в лунки, содержащие 3H6H1L1, 3H6H2L2, 3H6H3L3, 3H6H4L1, канакинумаб, добавляли 50 мкл рабочего раствора вторичного антитела козьих антител против человеческого IgG (H+L), меченных пероксидазой хрена; и в лунки, содержащие 3H6, добавляли 50 мкл рабочего раствора вторичного антитела козьих антител против мышинового IgG (H+L), меченных пероксидазой хрена. После четырехкратной промывки планшета и удаления остаточ-

ной жидкости в каждую лунку добавляли 50 мкл хромогенного раствора ТМБ для проявления цвета в течение 5 минут вдали от света при комнатной температуре, затем в каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора для остановки реакции. Затем планшет немедленно помещали в устройство для чтения планшетов, и значение ОП каждой лунки в планшете считывали при длине волны 450 нм.

Программное обеспечение SoftMax Pro 6.2.1 использовали для анализа и обработки данных. Строили 4-параметрические аппроксимирующие кривые, используя концентрацию антитела в качестве абсциссы и оптическую плотность по оси ординат. Результаты показаны на фиг. 1 и 2. Результаты анализа активности связывания ЗН6, ЗН6Н1Л1, ЗН6Н2Л2, ЗН6Н3Л3 и ЗН6Н4Л1 с человеческим IL-1 $\beta$ -His-Bio показаны в табл. 1 и 2 соответственно.

Таблица 1

Результаты анализа активности связывания ЗН6, ЗН6Н1Л1, ЗН6Н2Л2 и ЗН6Н3Л3 с человеческим IL-1 $\beta$ -His-Bio

Концентрация антител (мкг/мл)	Значение ОП связывания антиген-антитело (450 нм)									
	ЗН6Н1Л1		ЗН6Н2Л2		ЗН6Н3Л3		ЗН6		Канакинумаб	
1	2,914	2,927	2,864	2,879	2,865	2,905	2,516	2,602	2,871	2,874
0,333	2,979	2,980	2,953	2,928	2,880	2,874	2,617	2,597	2,902	2,883
0,111	2,950	2,989	2,958	2,953	2,892	2,865	2,411	2,386	2,895	2,887
0,037	2,809	2,771	2,777	2,732	2,634	2,662	2,036	1,936	2,643	2,682
0,012	2,167	2,267	2,197	2,182	2,001	2,016	1,225	1,225	2,065	2,118
0,004	1,352	1,264	1,300	1,439	1,225	1,178	0,598	0,623	1,256	1,199
0,001	0,660	0,619	0,630	0,669	0,590	0,566	0,287	0,293	0,581	0,559
0	0,04	0,042	0,041	0,041	0,050	0,039	0,039	0,041	0,039	0,040
Концентрация антител (мкг/мл)	Значение ОП связывания антиген-антитело (450 нм)									
	ЗН6Н1Л1		ЗН6Н2Л2		ЗН6Н3Л3		ЗН6		Канакинумаб	
	2									
Второе антитело	Козье антитело против человеческого IgG (H+L), меченное пероксидазой хрена, 50 мкл						Козье антитело против мышинового IgG (H+L), меченное пероксидазой хрена, 50 мкл		Козье антитело против человеческого IgG (H+L), меченное пероксидазой хрена, 50 мкл	
EC <sub>50</sub> (нМ)	0,036		0,034		0,042		0,099		0,039	

Таблица 2

Результаты анализа активности связывания ЗН6Н4Л1 с человеческим IL-1 $\beta$ -His-Bio

Разведение антител	Значение ОП связывания антиген-антитело (450 нм)			
	Канакинумаб		ЗН6Н4Л1	
0.333 мкг/мл	2,809	2,940	2,899	2,935
1:3	2,679	2,875	2,822	2,866
1:9	2,463	2,613	2,814	2,797
1:27	1,702	1,959	2,311	2,322
1:81	0,852	1,115	1,525	1,436
1:243	0,408	0,573	0,771	0,737
1:729	0,315	0,242	0,358	0,332
0	0,075	0,071	0,071	0,075
Второе антитело	Козье антитело против человеческого IgG (H+L), меченное пероксидазой хрена, 50 мкл			
EC <sub>50</sub> (нМ)	0,057		0,029	

Эти результаты показали, что

ЗН6, ЗН6Н1Л1, ЗН6Н2Л2, ЗН6Н3Л3 и ЗН6Н4Л1 могут эффективно связываться с человеческим IL-1 $\beta$ -His-Bio, причем эффективность связывания зависит от дозы;

В тех же условиях анализа эффективность связывания ЗН6Н1Л1, ЗН6Н2Л2 и ЗН6Н4Л1 с антигеном человеческого IL-1 $\beta$ -His-Bio зависит от дозы, и активность связывания превосходит активность коммерчески доступного лекарственного средства канакинумаба для той же мишени; в то время как связывающая активность ЗН6Н3Л3 сравнима с таковой канакинумаба.

Пример 5. Анализ активности антител ЗН6, ЗН6Н1Л1, ЗН6Н2Л2, ЗН6Н3Л3 и ЗН6Н4Л1, конкурирующих с человеческим IL-1R1(1-332)-His за связывание с человеческим IL-1 $\beta$ -hFc (ИФА).

Планшет покрывали 50 мкл 4 мкг/мл человеческого IL-1 $\beta$ -hFc в каждую лунку и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. После однократной промывки планшета и удаления остаточной жидкости каждую лунку блокировали 300 мкл 1% раствора БСА (растворенного в ФСБ) и планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 2 часов. Затем планшет промывали трижды и удаляли остаточную жидкость. Антитело разбавляли до 2 мкг/мл (конечная концентрация: 1 мкг/мл) в качестве начальной концентрации и выполняли градиентное разбавление 1:3, чтобы получить в общей сложности 7 концентраций в дополнение к пустому контролю. Указанные выше концентрации тестировали в двух дублирующих лунках с конечным объемом 50 мкл на лунку, и планшет инкубировали в течение 10 мин. 50 мкл 0,08 мкг/мл (конечная концентрация: 0,04 мкг/мл) или 0,1 мкг/мл (конечная концентрация: 0,05 мкг/мл) человеческого IL-1R1(1-332)-his добавляли в каждую лунку в планшете, осторожно смешивали с антителом в соотношении объемов 1:1, при этом конечный объем в каждой лунке составлял 100 мкл. Затем планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. После трехкратной промывки планшета и удаления остаточной жидкости в каждую лунку добавляли 50 мкл рабочего раствора мышинового моноклонального антитела против His (меченного пероксидазой хрена), и планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. После четырехкратной промывки планшета и удаления остаточной жидкости в каждую лунку добавляли 50 мкл хромогенного раствора ТМБ для проявления цвета в течение 10 или 5 минут вдали от света при комнатной температуре, затем в каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора, чтобы остановить реакцию. Затем планшет немедленно помещали в устройство для чтения планшетов, и значение ОП каждой лунки в планшете считывали при длине волны 450 нм.

Данные анализировали и обрабатывали с использованием программного обеспечения SoftMax Pro 6.2.1, и строили 4-параметрические кривые с использованием концентрации антител по оси абсцисс и оптической плотности по оси ординат. Результаты показаны на фиг. 3 и 4. Результаты анализа активности ЗН6, ЗН6Н1Л1, ЗН6Н2Л2, ЗН6Н3Л3 и ЗН6Н4Л1, конкурирующих с человеческим IL-1R1(1-332)-his за связывание с человеческим IL-1 $\beta$ -hFc, показаны в табл. 3 и 4, соответственно.

Таблица 3

Результаты анализа активности 3Н6, 3Н6Н1L1, 3Н6Н2L2 и 3Н6Н3L3, конкурирующих с человеческим IL-1R1(1-332)-his за связывание с человеческим IL-1 $\beta$ -hFc

Концентрация антител (мкг/мл)	Значение ОП (450 нм) антитела, блокирующего связывание антигена с рецептором человеческого IL-1R1(1-332)-his									
	3Н6Н1L1		3Н6Н2L2		3Н6Н3L3		3Н6		Канакинумаб	
1,000	0,050	0,049	0,057	0,070	0,057	0,058	0,049	0,050	0,053	0,052
0,333	0,051	0,050	0,071	0,073	0,069	0,067	0,050	0,052	0,059	0,057
0,111	0,055	0,054	0,095	0,098	0,132	0,115	0,063	0,058	0,091	0,092
0,037	0,206	0,221	0,242	0,198	0,361	0,348	0,266	0,283	0,366	0,379
0,012	0,521	0,498	0,504	0,453	0,505	0,584	0,560	0,516	0,572	0,579
0,004	0,635	0,677	0,681	0,618	0,693	0,697	0,682	0,712	0,727	0,684
0,001	0,630	0,687	0,736	0,679	0,748	0,715	0,787	0,773	0,577	0,720
0,000	0,621	0,693	0,804	0,779	0,780	0,807	0,810	0,818	0,555	0,765
EC <sub>50</sub> (нМ)	0,155		0,108		0,182		0,137		0,260	

Таблица 4

Результаты анализа активности 3Н6Н4L1, конкурирующего с человеческим IL-1R1(1-332)-his за связывание с человеческим IL-1 $\beta$ -hFc

Концентрация антител (мкг/мл)	Значение OD (450 нм) антитела, блокирующего связывание антигена с рецептором человеческого IL-1R1(1-332)-his			
	Канакинумаб		3Н6Н4L1	
1,000	0,093		0,088	
0,333	0,104		0,126	
0,111	0,519		0,526	
0,037	0,736		0,705	
0,012	0,797		0,706	
0,004	0,765		0,735	
0,001	0,738		0,559	
0,000	0,669		0,719	
EC <sub>50</sub> (нМ)	0,961		0,530	

Эти результаты показали, что

3Н6, 3Н6Н1L1, 3Н6Н2L2, 3Н6Н3L3 и 3Н6Н4L1 могут эффективно блокировать связывание антигена человеческого IL-1 $\beta$ -hFc с рецептором человеческого IL-1R1(1-332)-his, причем эффективность блокирования зависит от дозы, а их конкурентная связывающая активность выше, чем у коммерчески доступного лекарственного средства канакинумаб для той же мишени.

Пример 6. Определение константы сродства антитела 3Н6Н4L1 к человеческому IL-1 $\beta$ .

Константу сродства антитела к человеческому IL-1 $\beta$ -his определяли с использованием прибора для измерения молекулярного взаимодействия Biacore. Антитело иммобилизовали на поверхности чипа CM5 в буфере ФСБТ путем иммобилизации по аминокислотной группе со значением сигнала около 1000 ЕО. Антитела связывались с человеческим IL-1 $\beta$  в концентрации 1,56-25 нМ (2-кратное градиентное разведение) в течение 120 с при скорости потока 30 мкл/мин, и они диссоциировали в течение 600 с. Чип регенерировали с использованием 3М MgCl<sub>2</sub> в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин. Данные получали с использованием программного обеспечения Biacore Control 2.0 и анализировали с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation 2.0. Результаты представлены в табл. 5 и на фиг. 5 и фиг. 6.

Таблица 5

Результаты анализа константы сродства 3Н6Н4Л1 к человеческому IL-1 $\beta$ 

Название	K <sub>D</sub> (M)	ka (1/Ms)	SE (ka)	kd (1/s)	SE (kd)	Rmax (EO)
3Н6Н4Л1	8,79E-11	1,44E+06	3,15E+03	1,27E-04	1,75E-07	112,49-122,37
Канакинумаб	9,79E-11	5,24E+05	6,84E+02	5,13E-05	1,43E-07	76,61-86,37

Эти результаты показали следующее.

Константа сродства 3Н6Н4Л1 к человеческому IL-1 $\beta$  составляла 8,79E-11M, а константа сродства канакинумаба к человеческому IL-1 $\beta$  составляла 9,79E-11M, что позволяет предположить, что 3Н6Н4Л1 имеет более сильную связывающую способность с человеческим IL-1 $\beta$ .

Пример 7. Анализ клеточной биологической активности антитела 3Н6Н4Л1.

1. Цитологический анализ активности 3Н6Н4Л1 в отношении блокирования способности IL-1 $\beta$  индуцировать секрецию IL-6 клетками MRC-5.

Клетки MRC-5 человека (приобретенные в Клеточном центре Китайской академии наук) переваривали и подсчитывали обычным образом, и 7500 клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет с плоским дном и культивировали в инкубаторе для клеток; через 24 часа (когда рост клеток достиг 80% конfluence) проводили обработку дозами: для антитела были установлены 4 концентрации (0,37 нМ, 1,11 нМ, 3,33 нМ и 10 нМ) и 3 концентрации (5 пМ, 50 пМ и 500 пМ) были установлены для IL-1 $\beta$  (приобретенного у Sino Biological Inc.), 50 пМ IL-1 $\beta$  использовали в группе антител (антитело и IL-1 $\beta$  инкубировали при температуре 37°C в течение 20 мин заранее) в дополнение к пустой контрольной группе и изотипической контрольной группе; после дозирования группы культивировали в течение 24 ч; клеточные супернатанты собирали и анализировали с использованием набора реагентов для твердофазного ИФА IL-6 (приобретенного у Dakewe Biotechnology Co., Ltd.). Результаты анализа показаны на фиг. 7 и в табл. 6.

Таблица 6

Активность ЗН6Н4L1, градиентно ингибирующая активность  
IL-1 $\beta$  в отношении индуцирования секреции IL-6 клетками MRC-5

Группа/концентрация	ОП (450 нм)		Измеренная концентрация (пг/мл)		Коэффициент разбавления	Исходная концентрация (пг/мл) (определенная концентрация $\times$ коэффициент разбавления)	
	Лунка а 1	Лунка а 2	Лунка 1	Лунка 2		Лунка 1	Лунка 2
ФСБ	0,595	0,446	26,6	18,3	5	132,8	91,4
Человеческий IgG/10 нМ	1,301	1,476	92,8	123,9	200	18552,6	24781,8
IL-1 $\beta$ /5 пМ	1,678	1,404	178,7	109,8	50	8936,3	5490,7
IL-1 $\beta$ /50 пМ	1,597	1,666	153,4	174,5	200	30681,6	34898,6
IL-1 $\beta$ /500 пМ	1,207	1,228	79,6	82,4	500	39817,0	41182,0
Канакинумаб/0,37 нМ	0,432	0,425	17,6	17,2	100	1758,0	1720,1
Канакинумаб/1,11 нМ	0,375	0,439	14,7	17,9	50	736,3	896,3
Канакинумаб/3,33 нМ	0,646	0,590	29,7	26,3	20	594,3	525,0
Канакинумаб/10 нМ	0,305	0,318	11,4	12,0	20	227,1	239,3
ЗН6Н4L1/0,37 нМ	1,029	1,143	59,7	71,8	50	2984,1	3591,5
ЗН6Н4L1/1,11 нМ	1,067	1,091	63,4	66,1	20	1268,8	1321,0
ЗН6Н4L1/3,33 нМ	0,665	0,666	30,9	30,9	20	618,0	618,5
ЗН6Н4L1/10 нМ	0,469	0,609	19,5	27,4	10	195,2	274,4

Эти результаты показали, что IL-1 $\beta$  может заметно стимулировать клетки MRC-5 секретировать IL-6 дозозависимым образом; ЗН6Н4L1 может специфично ингибировать активность IL-1 $\beta$  в отношении индуцирования секреции IL-6 клетками MRC-5, демонстрируя специфичную нейтрализующую активность ЗН6Н4L1 в отношении IL-1 $\beta$ .

2. ЗН6Н4L1 блокирует способность IL-1 $\beta$  к активации сигнального пути NF- $\kappa$ B.

В этом эксперименте нейтрализующую биоактивность ЗН6Н4L1, блокирующую способность IL-1 $\beta$  к активации сигнального пути NF- $\kappa$ B, измеряли с помощью анализа репортерного гена люциферазы.

(1) Конструкция клетки 293T-NF- $\kappa$ B-LUC.

Клетки 293T переваривали панкреатином и субкультивировали; среду обновляли средой орti-DMEM за 2 ч до трансфекции; 500 мкл среды орti-DMEM добавляли в стерильную пробирку EP с последующим добавлением 3 мкг плазмиды pNF- $\kappa$ B-Luc2P-hygro; 500 мкл среды орti-DMEM добавляли в стерильную пробирку EP с последующим добавлением 8 мкл липофектамина 2000; разбавленный липофектамин 2000 добавляли к разбавленным плазмидам, и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и равномерно по каплям добавляли в чашку для культивирования клеток; через 8 ч после трансфекции среду обновляли; и через 24 часа после трансфекции добавляли гигромицин в конечной концентрации 100 мкг/мл и клетки подвергали скринингу, используя лунку, содержащую нетрансфицированные плазмидой клетки 293T в качестве контроля. Через 7-10 дней клетки в контрольной лунке пол-

ностью погибли, и отобранные клетки собирали для амплификации. Дозирование продолжали, оставляя концентрацию на уровне 100 мкг/мл. Таким образом, была получена стабильная клеточная линия 293T-NF-κB-LUC.

(2) Анализ нейтрализующей биоактивности 3Н6Н4L1, блокирующей способность IL-1β к активации сигнального пути NF-κB.

Клетки 293T-NF-κB-LUC стандартно переваривали и высевали в 96-луночный планшет из расчета 20000 клеток на лунку. После того, как клетки прилипли к стенке, добавляли IL-1β до конечной концентрации 1,65 нг/мл и устанавливали пустой контроль. Антитела канакинумаб и 3Н6Н4L1 добавляли одновременно с 5 градиентами для каждого антитела при конечных концентрациях 400 нг/мл, 100 нг/мл, 25 нг/мл, 6,25 нг/мл и 1,56 нг/мл соответственно. После 6 ч совместной инкубации супернатант удаляли, добавляли 50 мкл ФСБ и 50 мкл субстрата Bright-Glo™ для прохождения реакции в течение 5 мин, и смесь анализировали с помощью аппарата.

Результаты показаны на фиг. 8 и 9.

Эти результаты показали, что

IL-1β может эффективно активировать экспрессию репортерных генов люциферазы, зависящую от сигнального пути NF-κB, очевидным дозозависимым образом;

3Н6Н4L1 может специфично блокировать способность IL-1β к активации сигнального пути NF-κB дозозависимым образом.

Результаты показали, что 3Н6Н4L1 может эффективно блокировать способность IL-1β к активации NF-κB в зависимом от IL-1β сигнальном пути NF-κB, демонстрируя его специфичную нейтрализующую активность в отношении IL-1β.

Пример 8. 3Н6Н4L1 облегчает ревматоидный артрит в мышинной модели коленного артрита, индуцированного клетками NIH/3T3, трансфицированными человеческим IL-1β.

46 мышей линии BALB/c разделяли на 6 групп по массе тела, а именно нормальная группа, модельная группа, группа положительного контроля, группа с низкой дозой 3Н6Н4L1, группа со средней дозой 3Н6Н4L1 и группа с высокой дозой 3Н6Н4L1; за исключением 6 мышей в нормальной группе, в каждой группе было по 8 мышей.

Перед посевом клеток, мышам, в соответствии с массой тела и дозируемым объемом, подкожно вводили канакинумаб в группе положительного контроля, подкожно вводили анти-HEL в модельной группе, вводили 3Н6Н4L1 в соответствующих концентрациях в соответствующих группах дозирования 3Н6Н4L1, и подкожно вводили изоволюметрический физиологический раствор.

Клетки NIH/3T3 (приобретенные в Американской коллекции типовых культур) и клетки Lenti-IL-1β-NIH/3T3 собирали в боксе биологической безопасности. Клеточную линию Lenti-IL-1β-NIH/3T3, которая стабильно секретирует и экспрессирует IL-1β, получали путем трансфекции вектора Lenti-IL-1β в клетки NIH/3T3 и скрининга. Когда необходимое количество клеток было достигнуто, клетки NIH/3T3, Lenti-IL-1β-NIH/3T3 собирали. В боксе биологической безопасности среду с клетками пипетировали, клетки промывали один раз ФСБ и расщепляли подходящим количеством 0,05% трипсина-ЭДТА (1×) в течение 1 мин, затем добавляли полную среду DMEM, содержащую 10% ФБС, чтобы остановить переваривание. Суспензию клеток центрифугировали в течение 4 мин при 1200 об/мин, и после удаления супернатанта ресуспендировали в бессывороточной среде DMEM, подсчитывали и помещали на лед для дальнейшего использования после того, как концентрация клеток была доведена до 2000000 клеток/мл.

После анестезии мышей BALB/c внутрибрюшинной инъекцией 7,5 мл/кг 3,5% хлоралгидрата, в полости коленного сустава мышей в нормальной группе вводили 25 мкл/мышь (50000 клеток/мышь) суспензии клеток NIH/3T3, а другим мышам вводили 25 мкл/мышь (50000 клеток/мышь) суспензии клеток Lenti-IL-1β-NIH/3T3. После инокуляции рану коленного сустава зашивали и наносили 20-кратно разведенный пенициллин в физиологическом растворе. На 5-й день после инокуляции клеток мышей в каждой группе подвергали эвтаназии путем смещения шейных позвонков, рассекали коленные суставы пораженных конечностей и длину (мм) и ширину (мм) синовиальной оболочки пораженных конечностей мышей измеряли штангенциркулем. Данные выражали как среднее значение ± стандартная ошибка (± CO), а результаты оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа после межгруппового сравнения, осуществленного программным обеспечением GraphPad Prism 5, что позволило определить значимую разницу при  $P < 0,05$  и высоко значимую разницу при  $P < 0,01$ .

Результаты показаны на фиг. 10, 11 и 12.

На фиг. 10 показано, что патологическое поведение очевидно у мышей модельной группы по сравнению с мышами в нормальной группе ( $P < 0,01$ ). После введения канакинумаба и высоких и средних доз 3Н6Н4L1 в соответствующих группах патологическое поведение мышей с ревматоидным артритом эффективно улучшилось ( $P < 0,01$ ), в то время как низкая доза 3Н6Н4L1 оказалась неэффективной для улучшения патологического поведения мышей с ревматоидным артритом ( $P > 0,05$ ) по сравнению с модельной группой. Между тем, 3Н6Н4L1 имеет определенную взаимосвязь "доза-эффект" в отношении улучшения степени патологического поведения мышей. По сравнению с группой положительного контроля, в

группах, получавших среднюю и низкую дозы 3Н6Н4L1, действие этого антитела оказалось менее эффективным ( $P < 0,01$ ), чем в группе положительного контроля, а в группе, получавшей высокую дозу 3Н6Н4L1, эффективность этого антитела оказалась эквивалентной эффективности в группе положительного контроля ( $P > 0,05$ ).

На фиг. 11 показано, что площадь коленного сустава пораженной конечности мышей в модельной группе значительно увеличена по сравнению с нормальной группой ( $P < 0,01$ ). После введения в группе положительного контроля (канакинумаб) и в группах со средней и высокой дозой 3Н6Н4L1 явно уменьшилась площадь отека пораженной конечности у мышей с ревматоидным артритом ( $P < 0,01$ ), тогда как в группе с низкой дозой 3Н6Н4L1 введение этого антитела не оказало очевидного влияния на уменьшение площади отека пораженной конечности мышей с ревматоидным артритом ( $P > 0,05$ ) по сравнению с модельной группой. Между тем, имеет место определенная связь между дозой 3Н6Н4L1 и его влиянием на уменьшения площади отека пораженной конечности мышей с ревматоидным артритом. Эквивалентная доза 3Н6Н4L1 имеет эффективность, эквивалентную коммерчески доступному лекарственному средству канакинумаб для той же мишени ( $P > 0,05$ ).

На фиг. 12 показано, что масса тела мышей в модельной группе значительно снижена по сравнению с массой тела в нормальной группе ( $P < 0,01$ ). Очевидно, что после введения коммерчески доступное лекарственное средство канакинумаб для той же мишени и высокая доза 3Н6Н4L1 могут снизить потерю массы тела мышей с артритом по сравнению с модельной группой ( $P < 0,05$ ). По сравнению с группой положительного контроля эквивалентная доза 3Н6Н4L1 имеет эффективность, эквивалентную коммерчески доступному лекарственному средству канакинумаб для той же мишени ( $P > 0,05$ ).

Выше были подробно описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, но настоящее изобретение не ограничивается этими вариантами осуществления. Специалисты в данной области техники могут сделать различные эквивалентные модификации или замены, не нарушая сущности настоящего изобретения. Эти эквивалентные модификации или замены включены в объем настоящего изобретения, определенный формулой изобретения настоящей заявки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-IL-1 $\beta$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19 соответственно; и антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22 соответственно.
2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 14; и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 16.
3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; или переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.
4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb, определяющего комплементарность области фрагмента, одноцепочечного антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и диатела.
5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с белком IL-1 $\beta$  с  $K_D$  менее  $10^{-5}$  М.
6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с белком LL-1 $\beta$  с  $K_D$  менее  $10^{-6}$  М, менее  $10^{-7}$  М, менее  $10^{-8}$  М, менее  $10^{-9}$  М или менее  $10^{-10}$  М или менее.
7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.5 или 6, где  $K_D$  измеряют с помощью прибора для измерения молекулярного взаимодействия Biacore.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит не-CDR-область, полученную от видов, отличных от мышей.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит не-CDR-область, полученную из человеческого антитела.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область, выбранную из константных областей человеческого IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig или С-область цепи гамма-4 Ig, а константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig.

12. Антитело по любому из пп.1-3, где антитело продуцируется линией гибридомных клеток LT010, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) под регистрационным номером ССТСС NO: C2018133.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и низкомолекулярное лекарственное средство, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12.

14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.13, где низкомолекулярное лекарственное средство представляет собой низкомолекулярное цитотоксическое лекарственное средство.

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.14, где низкомолекулярное лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое лекарственное средство против опухолей.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с низкомолекулярным лекарственным средством через линкер, где линкер представляет собой гидразоновую связь, дисульфидную связь или пептидную связь.

17. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.13-16, где молярное отношение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к низкомолекулярному лекарственному средству составляет от 1:1 до 1:4.

18. Биспецифичное антитело, содержащее первую функциональную область белка и вторую функциональную область белка,

где первая функциональная область белка нацелена на IL-1 $\beta$  и

вторая функциональная область белка нацелена на мишень, отличную от IL-1 $\beta$ ;

где первая функциональная область белка представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12.

19. Биспецифичное антитело по п.18, где биспецифичное антитело находится в форме IgG-scFv.

20. Биспецифичное антитело по п.18, где первая функциональная область белка содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, и вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело.

21. Биспецифичное антитело по п.18, где первая функциональная область белка содержит одноцепочечное антитело по п.4, и вторая функциональная область белка представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

22. Биспецифичное антитело по п.18, где первая и вторая функциональные области белка связаны напрямую или через линкерный фрагмент.

23. Биспецифичное антитело по п.22, где линкерный фрагмент представляет собой (GGGS) $m$ , где  $m$  является положительным целым числом, таким как 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

24. Биспецифичное антитело по п.22, где линкерный фрагмент представляет собой SS(GGGS) $n$ , где  $n$  является положительным целым числом, таким как 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

25. Биспецифичное антитело по п.18, где количество функциональных областей первого и второго белка независимо равно 1, 2 или более.

26. Биспецифичное антитело по любому из пп.18-25, где одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

27. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-IL-1 $\beta$  антитела, и нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-IL-1 $\beta$  антитела, где

переменная область тяжелой цепи антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19 соответственно, и

переменная область легкой цепи антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22 соответственно.

28. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.27, где аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела

выбрана из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 14, и

аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела выбрана из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 16.

29. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.27, где аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 2, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 4;

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 6, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 8;

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 10, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 12; или

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 14, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 16.

30. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.27, где молекула нуклеиновой кислоты содержит

нуклеотидные последовательности, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3,

нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 7,

нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11 или

нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15.

31. Вектор экспрессии, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.27-30.

32. Клетка-хозяин, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.27-30 или рекомбинантный вектор по п.31.

33. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-12, включающий в себя культивирование клетки-хозяина по п.32 в подходящих условиях и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клеточных культур.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

35. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-12 для получения лекарственного средства для лечения аутоиммунных заболеваний.

36. Применение по п.35, где аутоиммунное заболевание выбрано из ревматоидного артрита, рассеянного склероза, синдромов периодической лихорадки, периодического синдрома, связанного с рецептором ФНО (TRAPS), синдрома гипер-IgD (HIDS)/дефицита мевалонаткиназы (MKD), семейной средиземноморской лихорадки (FMF).

37. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-12 для получения лекарственного средства для лечения сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний.

38. Применение по п.37, где сердечно-сосудистое и цереброваскулярное заболевание выбрано из инфаркта миокарда, атеросклероза, артериального тромбоза и церебрального инсульта.

39. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-12 для получения лекарственного средства для лечения опухолей.

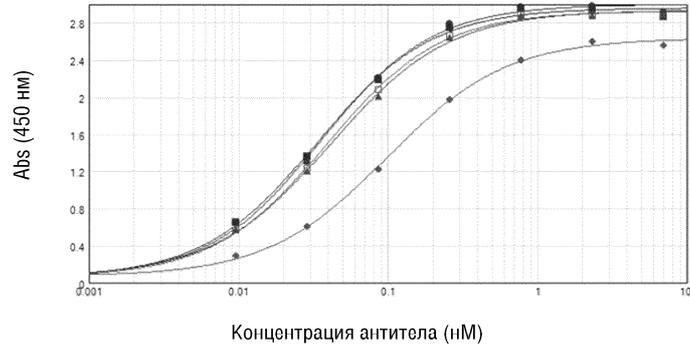
40. Применение по п.39, где опухоль выбрана из рака легких, гепатоцеллюлярной карциномы и острой миелоидной лейкемии.

41. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-12 для получения лекарственного средства для лечения криопирин-ассоциированных периодических синдромов у детей и взрослых.

42. Применение по п.41, где криопирин-ассоциированный периодический синдром у детей и взрослых выбран из семейного холодового аутовоспалительного синдрома, синдрома Макла-Уэллса, мульти-системного воспалительного заболевания с неонатальным началом, хронического детского неврологического кожно-суставного синдрома и семейной холодовой крапивницы.

43. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-12 для получения лекарственного средства для лечения артрита.

44. Применение по п.43, где артрит выбран из системного ювенильного идиопатического артрита, острого подагрического артрита и хронического подагрического артрита.



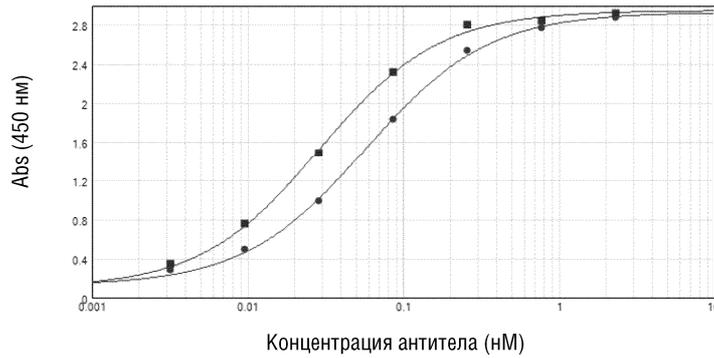
- ЗН6Н1Л1 (ЗН6Н1Л1: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)
- ЗН6Н2Л2 (ЗН6Н2Л2: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)
- ▲ ЗН6Н3Л3 (ЗН6Н3Л3: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)
- ◆ ЗН6 (ЗН6: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)
- Канакинумаб (Канакинумаб: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)

Результаты подбора кривой ▲

Подбор кривой: 4-параметра:  $y = D + \frac{A-D}{1 + (\frac{x}{EC50})^8}$

<b>ЗН6Н1Л1</b> $R^2 = 0.998$ EC50 = 0.036	<b>ЗН6Н2Л2</b> $R^2 = 0.998$ EC50 = 0.034	<b>ЗН6Н3Л3</b> $R^2 = 0.999$ EC50 = 0.042	<b>ЗН6</b> $R^2 = 0.999$ EC50 = 0.099	<b>Канакинумаб</b> $R^2 = 0.999$ EC50 = 0.039
---	---	---	---	---

Фиг. 1



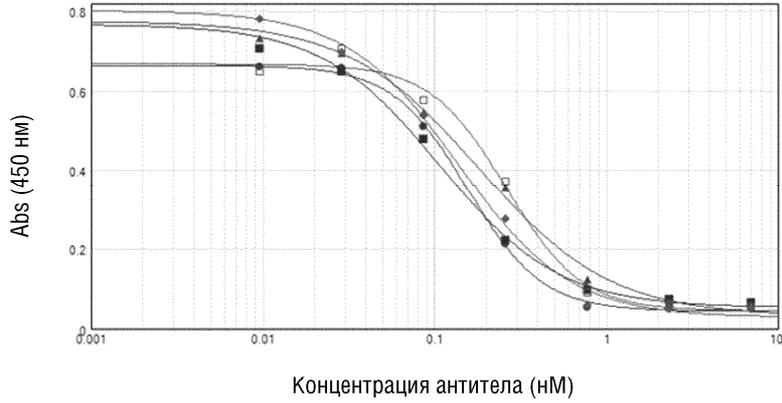
- Канакинумаб (Канакинумаб: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)
- ЗН6Н4Л1 (ЗН6Н4Л1: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)

Результаты подбора кривой ▲

Подбор кривой: 4-параметра:  $y = D + \frac{A-D}{1 + (\frac{x}{EC50})^8}$

<b>Канакинумаб</b> $R^2 = 0.999$ EC50 = 0.057	<b>ЗН6Н4Л1</b> $R^2 = 0.999$ EC50 = 0.029
---	---

Фиг. 2



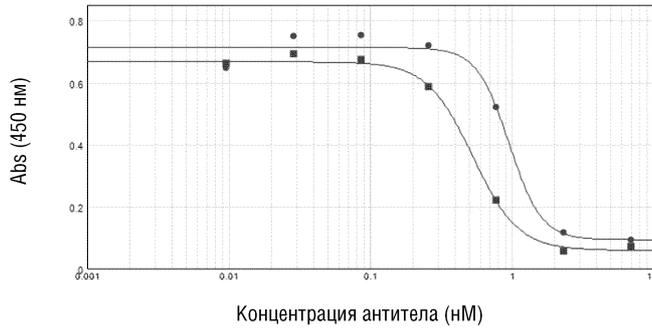
- ЗН6Н1Л1 (ЗН6Н1Л1: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)
- ЗН6Н2Л2 (ЗН6Н2Л2: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)
- ▲ ЗН6Н3Л3 (ЗН6Н3Л3: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)
- ◆ ЗН6 (ЗН6: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)
- Канакинумаб (Канакинумаб: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)

Результаты подбора кривой ▲

Подбор кривой: 4-параметра:  $y = D + \frac{A - D}{1 + (\frac{x}{EC50})^n}$

<b>ЗН6Н1Л1</b> $R^2 = 0.999$ EC50 = 0.155	<b>ЗН6Н2Л2</b> $R^2 = 0.997$ EC50 = 0.108	<b>ЗН6Н3Л3</b> $R^2 = 0.997$ EC50 = 0.182	<b>ЗН6</b> $R^2 = 0.997$ EC50 = 0.137	<b>Канакинумаб</b> $R^2 = 0.993$ EC50 = 0.260
---	---	---	---	---

Фиг. 3



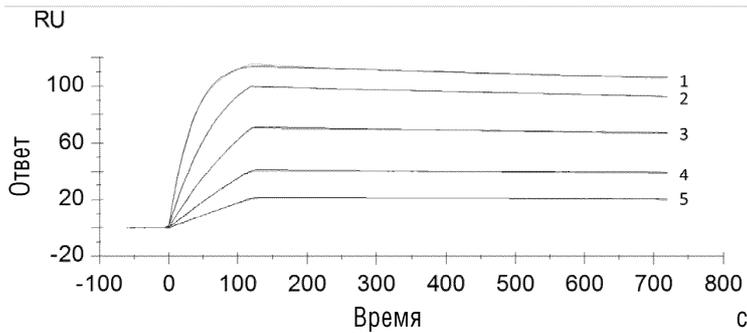
- \* Канакинумаб (Канакинумаб: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)
- ЗН6Н4Л1 (ЗН6Н4Л1: Среднее значение в сравнении с Концентрацией)

Результаты подбора кривой ▲

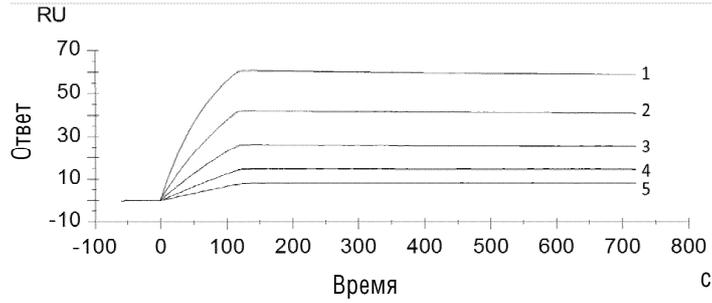
Подбор кривой: 4-параметра:  $y = D + \frac{A - D}{1 + (\frac{x}{EC50})^n}$

<b>Канакинумаб</b> $R^2 = 0.986$ EC50 = 0.961	<b>ЗН6Н4Л1</b> $R^2 = 0.997$ EC50 = 0.530
---	---

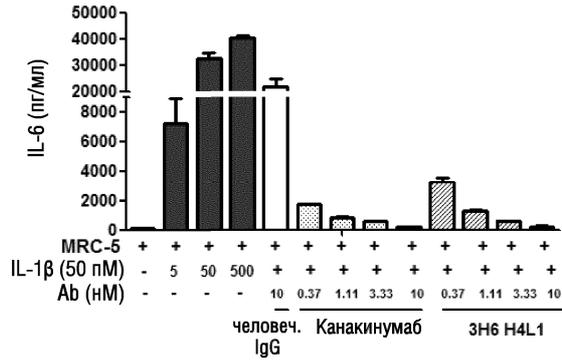
Фиг. 4



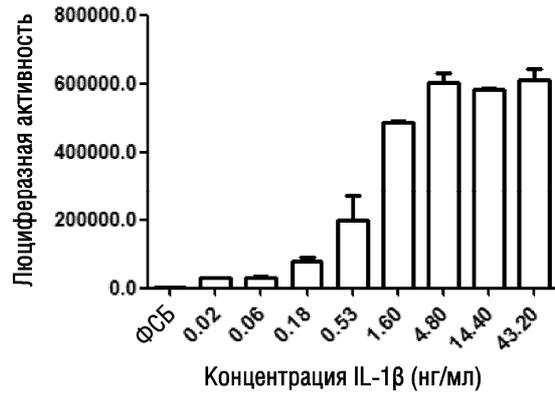
Фиг. 5



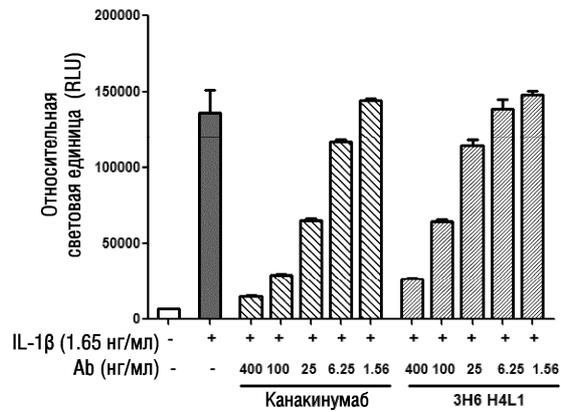
Фиг. 6



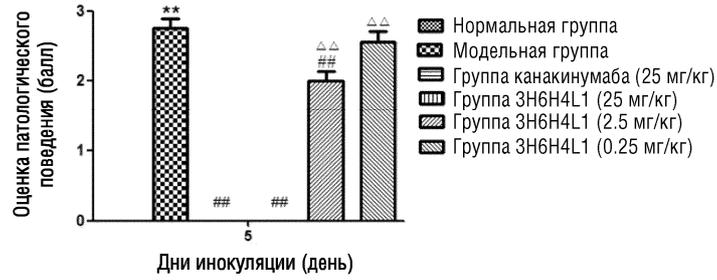
Фиг. 7



Фиг. 8

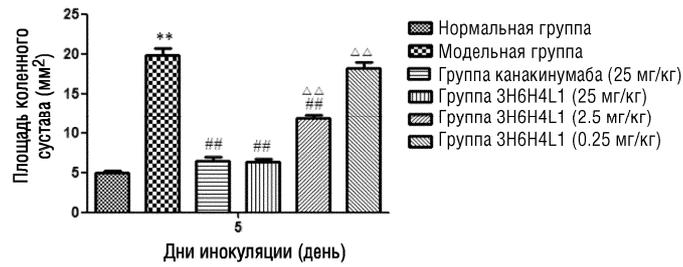


Фиг. 9



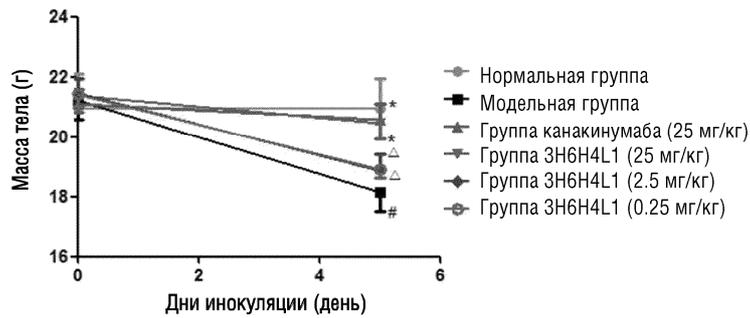
\*\* $p < 0.01$ , по сравнению с Нормальной группой  
 ## $p < 0.01$ , по сравнению с Модельной группой  
 $\Delta\Delta p < 0.01$ , по сравнению с Группой канакинумаба

Фиг. 10



\*\* $p < 0.01$ , по сравнению с Нормальной группой  
 ## $p < 0.01$ , по сравнению с Модельной группой  
 $\Delta\Delta p < 0.01$ , по сравнению с Группой канакинумаба

Фиг. 11



# $p < 0.05$ , по сравнению с Нормальной группой  
 \* $p < 0.05$ , по сравнению с Модельной группой  
 $\Delta p < 0.05$ , по сравнению с Группой канакинумаба

Фиг. 12

