



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/2863 (2025.01); C07K 2317/56 (2025.01); C07K 2317/565 (2025.01)

(21)(22) Заявка: 2023135666, 28.12.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.12.2023Дата регистрации:
22.04.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.12.2023

(45) Опубликовано: 22.04.2025 Бюл. № 12

Адрес для переписки:

188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр.
Орлова Роща, 1, ФГБУ ПИЯФ НИЦ
"Курчатовский институт"

(72) Автор(ы):

Демьянов Антон Викторович (RU),
Жахов Александр Владимирович (RU),
Гараева Луиза Абдул-Азизовна (RU),
Емельянова Светлана Сергеевна (RU),
Никитина Анастасия Владимировна (RU),
Путевич Елена Дмитриевна (RU),
Биджиева Медина Сагитовна (RU),
Потысьева Алина Сергеевна (RU),
Волницкий Андрей Васильевич (RU),
Кванчiani Варвара Валерьевна (RU),
Сидорова Жанна Юрьевна (RU),
Виноградова Дарья Сергеевна (RU),
Грачев Александр Альбертович (RU),
Толичева Ольга Андреевна (RU),
Бурдаков Владимир Станиславович (RU),
Касацкий Павел Сергеевич (RU),
Верлов Николай Александрович (RU),
Штам Татьяна Александровна (RU),
Трашков Александр Петрович (RU),
Коневега Андрей Леонидович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Петербургский институт
ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра
"Курчатовский институт" (НИЦ
"Курчатовский институт" - ПИЯФ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 8143025 B2, 27.03.2012. EA 32679
B1, 31.07.2019. RU 2670052 C1, 17.10.2018. RU
2788949 C1, 26.01.2023. YAN WU et al., Anti-
Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1
Antagonist Antibody as a Therapeutic Agent for
Cancer, Clin. Cancer Res., 2006, vol.12(21),
pp.6573-6584.

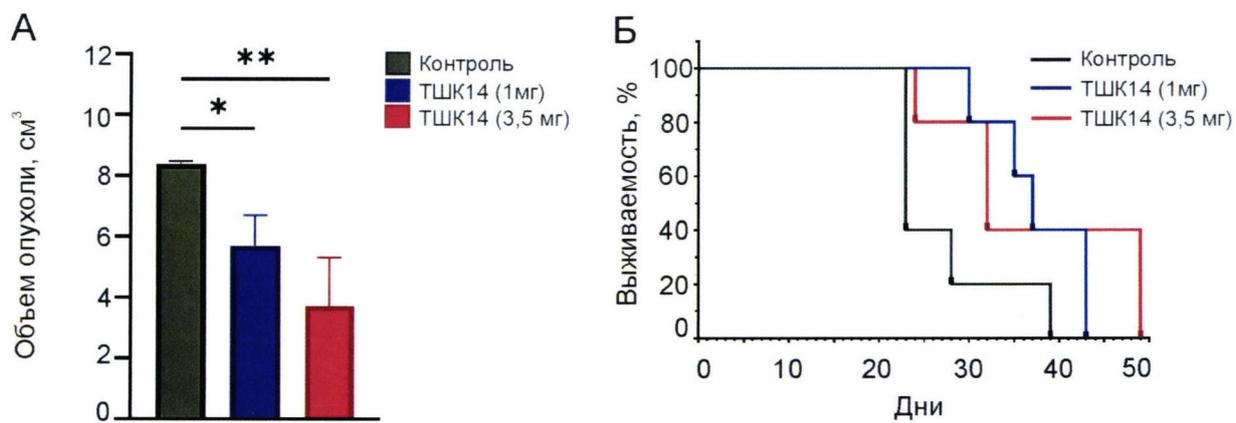
(54) Антитела против рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 (VEGFR1) человека

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и биохимии. Предложено

моноклональное антитело, специфически связывающееся с рецептором фактора роста эндотелия сосудов 1 (VEGFR-1) человека с высокой аффинностью. Изобретение

обеспечивает подавление роста опухолевых клеток кишечника и возможность использования антител в доклинических исследованиях для лечения рака кишечника человека. 5 ил., 6 пр.



Фиг. 5

RU 2838680 C1

RU 2838680 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/2863 (2025.01); C07K 2317/56 (2025.01); C07K 2317/565 (2025.01)(21)(22) Application: **2023135666, 28.12.2023**(24) Effective date for property rights:
28.12.2023Registration date:
22.04.2025

Priority:

(22) Date of filing: **28.12.2023**(45) Date of publication: **22.04.2025** Bull. № 12

Mail address:

188300, Leningradskaya obl., g. Gatchina, mkr.
Orlova Roshcha, 1, FGBU PIYAF NITS
"Kurchatovskij institut"

(72) Inventor(s):

**Demyanov Anton Viktorovich (RU),
Zhakhov Aleksandr Vladimirovich (RU),
Garaeva Luiza Abdul-Azizovna (RU),
Emelyanova Svetlana Sergeevna (RU),
Nikitina Anastasiya Vladimirovna (RU),
Putevich Elena Dmitrievna (RU),
Bidzhieva Medina Sagitovna (RU),
Potyseva Alina Sergeevna (RU),
Volnitskij Andrej Vasilevich (RU),
Kvanchiani Varvara Valerevna (RU),
Sidorova Zhanna Yurevna (RU),
Vinogradova Darya Sergeevna (RU),
Grachev Aleksandr Albertovich (RU),
Tolicheva Olga Andreevna (RU),
Burdakov Vladimir Stanislavovich (RU),
Kasatskij Pavel Sergeevich (RU),
Verlov Nikolaj Aleksandrovich (RU),
Shtam Tatyana Aleksandrovna (RU),
Trashkov Aleksandr Petrovich (RU),
Konevega Andrej Leonidovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie "Peterburgskij institut yadernoj
fiziki im. B.P. Konstantinova Natsionalnogo
issledovatelskogo tsentra "Kurchatovskij institut"
(NITS "Kurchatovskij institut" - PIYAF) (RU)**

(54) **HUMAN VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 1 (VEGFR1) ANTIBODY**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

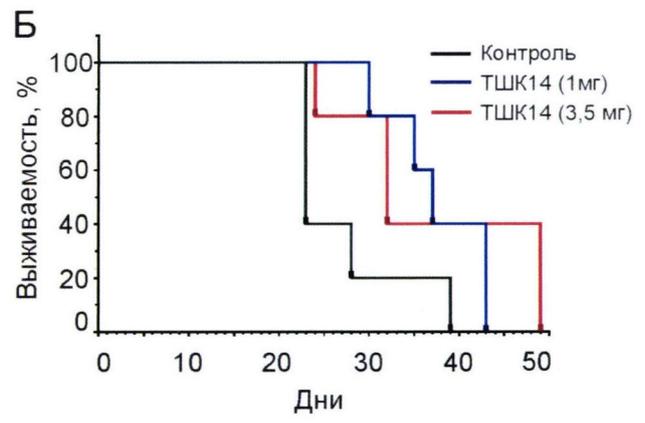
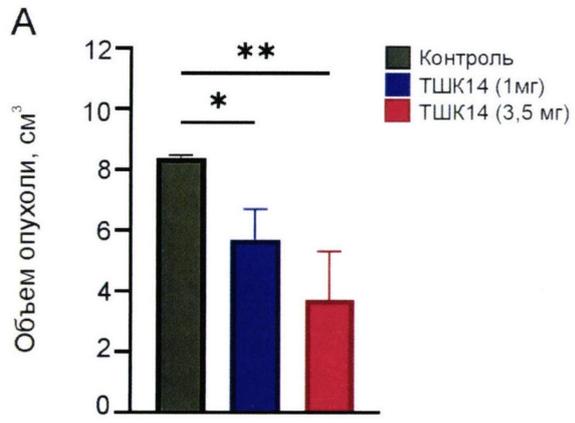
SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and biochemistry. Presented is a monoclonal antibody specifically binding to human vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR-1) with high affinity.

EFFECT: invention provides suppression of intestinal tumour cell growth and possibility of using antibodies in preclinical studies for treating human intestinal cancer.

1 cl, 5 dwg, 6 ex

RU 2 838 680 C1

RU 2 838 680 C1



Фиг. 5

Изобретение относится к области биотехнологии и биохимии, в частности к моноклональным антителам, способным специфически связываться с рецептором фактора роста эндотелия сосудов 1 (VEGFR-1) человека, а именно к мышинным моноклональным антителам против VEGFR-1.

5 Моноклональные антитела (МАТ) к VEGFR-1 представляют собой перспективный класс биологически активных веществ, выступающих в качестве эффективных инструментов в лечении различных заболеваний, особенно онкологических, благодаря своей способности регулировать сигнальные пути, вовлеченные в ангиогенез и иммунный ответ.

10 VEGFR-1 играет критическую роль в опухоль-ассоциированном ангиогенезе, обнаруживается на поверхности самих опухолевых клеток и других клеток опухолевого микроокружения [Melincovici C.S., Boşca A.B., Şuşman S., et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. Rom J Morphol Embryol. 2018. V. 59. №2. R 455]. Экспрессия VEGFR-1 в опухолевых клетках и сосудистой
15 ткани сопряжена с негативным прогнозом для пациентов, что подчеркивает важность воздействия на данный рецептор с помощью новых терапевтических стратегий. Блокирование данного рецептора приводит к подавлению пролиферации и усилению апоптоза опухолевых клеток, уменьшению васкуляризации опухоли, ингибированию
20 выработки иммуносупрессивных цитокинов опухоль-ассоциированными макрофагами, подавлению инвазии и метастазирования опухоли [Mabeta P, Steenkamp V. The VEGF/VEGFR Axis Revisited: Implications for Cancer Therapy. Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. №24. P. 15585. DOI: 10.3390/ijms232415585].

Технической задачей, на решение которой направлено настоящее изобретение, является расширение спектра моноклональных антител, против VEGFR-1.

25 Техническим результатом предлагаемого изобретения является создание нового моноклонального антитела мыши против рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 (VEGFR1), которое специфически и с высокой аффинностью ($K_d=4.02 \cdot 10^{-12}$ М) связывается с VEGFR-1 человека, обеспечивая подавление роста опухолевых клеток
30 кишечника.

Поставленная задача решается созданием моноклонального антитела мыши способного специфически связываться с рецептором фактора роста эндотелия сосудов 1 (VEGFR-1) человека, содержащего варибельный домен тяжелой цепи с
35 последовательностью SEQ ID NO: 1, варибельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 2 и гиперварибельные участки тяжелой и легкой цепей с последовательностями SEQ ID NO: 3-8.

В настоящем изобретении технический результат достигался получением нового моноклонального мышинового антитела (МАТ) ТШК14, распознающего VEGFR-1 человека, связанного с мембраной опухолевой клетки, при этом также обладающего
40 специфичностью к VEGFR-1 мыши, что позволяет использовать его в доклинических исследованиях. При этом, полученное антитело изотипа IgG2a связывается с опухолевыми клетками человека, имеет высокую аффинность ($K_D=4.02 \cdot 10^{-12}$ М) к VEGFR-1, а также обладает выраженным противоопухолевым эффектом в опытах на клеточных и животных моделях.

45 Способ получения антител

Технология получения мышинных антител включала в себя иммунизацию мышей антигеном рекомбинантного белка VEGFR-1 человека, получение и отбор позитивных гибридных клонов - продуцентов моноклональных антител с помощью

иммуноферментного анализа (ИФА), наработку антител в асцитах мышей, выделение и очистку антител на белок А-сефарозе и разноплановые исследования полученных антител. Нуклеотидные последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей полученного мышинового моноклонального антитела были изучены с помощью

5

Заявленное изобретение иллюстрируется следующими графическими материалами:

- на Фиг. 1 показаны результаты электрофореза моноклонального антитела ТШК14., где А - не восстанавливающие условия, Б - восстанавливающие условия, 1 - белковый маркер молекулярного веса, 2 - моноклональное антитело ТШК14;

10

- на Фиг. 2 показаны результаты иммуноферментного анализа (ИФА) моноклонального антитела ТШК14 к антигену-мишени VEGFR-1 человека (А) и мыши (Б);

15

- на Фиг. 3 показаны данные проточной цитометрии при визуализации VEGFR-1 с помощью МАТ ТШК14 и коммерческими МАТ (#BF0131 FLT1 Antibody) на поверхности клеток линий рака кишечника человека Hutu-80 (А) и LoVo (Б);

- на Фиг. 4 представлен анализ пролиферативной активности клеток линий рака кишечника человека Hutu-80 (А) и рака кишечника мыши СТ-26 (Б) при инкубации в присутствии МАТ ТШК14 к VEGFR-1 человека в концентрациях 0 мг/мл (контроль) и 0,8 мг/мл (ТШК14);

20

- на Фиг. 5 представлены результаты измерений размеров опухолевого узла (А) и кривые выживаемости животных (Б) после прививки клеток аденокарциномы мыши СТ-26 при применении МАТ ТШК14 в качестве терапевтического средства:

Группа 1 - мыши после введения клеток аденокарциномы мыши СТ-26;

25

Группа 2 - мыши после введения клеток аденокарциномы мыши СТ-26 и терапии МАТ ТШК14 в количестве 1,0 мг/мышь;

Группа 3 - мыши после введения клеток аденокарциномы мыши СТ-26 и терапии МАТ ТШК14 в количестве 3,5 мг/мышь.

Сущность и промышленная применимость изобретения поясняются следующими примерами.

30

Пример 1.1. Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела мыши к белку VEGFR-1 человека.

На первом этапе была проведена иммунизация шести мышей Balb/c препаратом рекомбинантного VEGFR-1 человека (Recombinant Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, RPB818Hu01, Cloud-Clone Corp.). Мыши иммунизировались в апоневроз задних конечностей в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ). Для иммунизации раствор препарата смешивали с равным объемом ПАФ (100 мкл/мышь) из расчета 20 мкг антигена на мышь. Через 2 недели после первой иммунизации все мыши были повторно иммунизированы раствором препарата рекомбинантного VEGFR-1 человека в смеси с неполным адьювантом Фрейнда (1:1), в объеме 100 мкл/мышь, в апоневроз задних конечностей, из расчета 20 мкг антигена на мышь. На четвертый день после последней иммунизации у наркотизированных и умерщвленных животных забирали лимфоциты паховых и брюшных лимфоузлов для гибридизации с миеломой SP2/0. Полученные лимфоциты смешивали с клетками миеломы в соотношении 1:1. Гибридизацию проводили по методу Мильштейна-Келлера [Kohler G. and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature, 1975, 256 (5517): 495-497]

45

инкубацией клеток в 50% растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ) (молекулярная масса 1500 Да) в течение 1,5 мин, после чего к суспензии последовательно с интервалом 1 мин добавляли среду RPMI-1640 объемами, равными первоначальному объему раствора

ПЭГ. После гибридизации клетки дважды отмывали культуральной средой и высевали в 96-луночные культуральные планшеты с суточными перитонеальными макрофагами, вносили гибридные клетки в количестве $1,5 \times 10^5$ клеток на лунку. Селекцию гибридов проводили в среде RPMI-1640 с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки, содержащей 10^4 М гипоксантина, 4×10^{-7} М аминоптерина и $1,6 \times 10^{-5}$ М тимидина. Итого в гибридизации были использованы 50 млн. лимфоцитов и 50 млн. клеток SP2/0, которые после гибридизации рассеивали на 10 плат. Через 10 дней платы исследовали под микроскопом. В платах с гибридными клетками было от 1 до 4 клонов, поэтому платы скринировали целиком. Скрининг позитивных клонов, секретирующих моноклональные антитела (МАТ) проводили методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), регистрируя связывание антител с антигеном, иммобилизованным в лунках планшета с высокой сорбционной емкостью. Для иммобилизации антигена в лунки 96-луночного планшета для ИФА вносили антиген VEGFR-1 (Recombinant Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, RPB818Hu01, Cloud-Clone Corp.) в концентрации 5 мкг/мл, приготовленный на 0,01 М карбонатном буферном растворе, pH 9,6 в объеме 100 мкл (Буфер А) и выдерживали при комнатной температуре в течение 16 ч. Лунки планшета отмывали забуференным физиологическим раствором, содержащим 0,05% Твин-20 (ЗФР-Т) и вносили в них супернатант культуральной жидкости гибридных клеток в объеме 50 мкл и 100 мкл ЗФР-Т. Планшет инкубировали при температуре плюс 37°C в течение 1 ч. После этого лунки планшета трижды отмывали раствором ЗФР-Т и добавляли в лунки антитела против иммуноглобулинов мыши, меченные пероксидазой хрена, в рабочем разведении. Планшет инкубировали при температуре плюс 37°C в течение 1 ч, затем пятикратно отмывали раствором ЗФР-Т, после чего добавляли хромогенный субстрат тетраметилбензидин (ТМБ). Клоны клеток, продуцирующие моноклональные антитела к препарату рекомбинантного VEGFR-1 человека, отбирали на основании положительной иммуноферментной реакции, которая проявлялась в виде окрашивания продукта хромогена - ТМБ. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 4N серной кислоты. Планшеты сканировали на планшетном ридере, измеряя поглощение при 450 нм.

Отобранные положительные клоны многократно клонировали методом конечных разведений с отбором наиболее продуктивных и стабильных клонов. Клетки высевали в ячейки планшетов, содержащие перитонеальные макрофаги нормальных мышей (фидер), в концентрациях приблизительно 2 клетки на ячейку с тем расчетом, чтобы в большинстве ячеек вырос единственный клон. Полученные одиночные клоны скринировали посредством ИФА, алгоритм проведения скрининга был аналогичным алгоритму первичного скрининга клонов. Если все клоны каждого типа антител оказывались положительными, то клетки любого положительного клона нарабатывали в культуральных флаконах путем культивирования при температуре плюс 37°C в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа. В качестве среды для культивирования использовали RPMI-1640, содержащую 20% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина. Культивирование проводили до получения необходимого количества клеток для введения в мышей (с целью наработки антител в асцитах) и для криоконсервации, из расчета 2 млн на мышь и 5 млн на ампулу. На 10 день после посева на клонирование платы с клетками клонов исследовали под микроскопом и отмечали лунки, в которых присутствовал только один клон. Культуральные жидкости одиночных клонов отбирали для анализа методом ИФА. В результате была отобрана гибридома, продуцирующая МАТ к рекомбинантному VEGFR-1 человека, которая была обозначена как: ТШК14.

Пример 1.2. Изотипирование МАТ ТШК14

Для клона ТШК14 было проведено изотипирование, с целью установления класса иммуноглобулинов. Изотипирование проводили методом непрямого твердофазного ИФА с использованием набора реактивов Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (SigmaAldrich, кат. № ISO2-1КТ), регистрируя связывание антител с антигеном, иммобилизованным в лунках планшета с высокой сорбционной емкостью. Для иммобилизации антигена в лунки 96-луночного планшета для ИФА вносили антиген VEGFR-1 в концентрации 5 мкг/мл, приготовленный на 0,01 М карбонатном буферном растворе, рН 9,6 в объеме 100 мкл (БуферА) и выдерживали при комнатной температуре в течение 16 ч. Лунки планшета отмывали забуференным физиологическим раствором, содержащим 0,05% Твин-20 (ЗФР-Т) и вносили в них супернатант культуральной жидкости гибридных клеток в объеме 50 мкл и 100 мкл (ЗФР-Т). Планшет инкубировали при температуре плюс 37°C в течение 1 ч. После этого лунки планшета вновь трижды отмывали раствором ЗФР-Т и добавляли в лунки антитела против изотипов иммуноглобулинов мыши IgG1, IgG2a IgG2b, IgG3, IgGM, IgGA, меченные пероксидазой хрена, в рабочем разведении. Планшет инкубировали при температуре плюс 37°C в течение 1 ч, затем пятикратно отмывали раствором ЗФР-Т, после чего добавляли хромогенный субстрат тетраметилбензидин (ТМБ). Изотип иммуноглобулинов, продуцируемых клоном, определяли на основании положительной иммуноферментной реакции на антитела к определенному анти-изотипическому антителу, которая проявлялась в виде окрашивания продукта хромогена - ТМБ. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 4N серной кислоты. Планшеты сканировали на планшетном ридере, измеряя поглощение при 450 нм. В результате изотипирования полученных моноклональных антител было выявлено, что МАТ ТШК14 представляют собой изотип IgG2a.

Пример 1.3. Нарботка моноклональных антител.

Нарботку моноклональных антител ТШК14 для изучения их свойств осуществляли в организме инбредных мышей линии BALB/c, которым до введения клеток гибридомы внутрибрюшинно (в/бр) вводили 0,5 мл 14-тетраметилпентадекана (пристана). Через 14 дней этим животным также в/бр вводили прививочную дозу 2×10^6 гибридных клеток на мышь. Через 10 дней после этого мышей переводили на питьевую диету физиологическим раствором и в течение последующих 2-8 дней наблюдали за ростом объема брюшной полости с асцитической жидкостью. При достижении брюшной полостью заметного объема асцитическую жидкость (объемом 3-5 мл), содержащую моноклональные антитела, отбирали и определяли в ней титр антител методом ИФА. Продукция МАТ в асцитических жидкостях мышей варьировала от 1 до 2 мг/мл.

Пример 1.4. Выделение и очистка моноклональных антител.

Полученную асцитическую жидкость осветляли центрифугированием (30 мин, 20000 об/мин), после чего моноклональные антитела выделяли из супернатанта осаждением сульфатом аммония, и затем очищали методами аффинной хроматографии с использованием сорбента с белком А. Осаждение сульфатом аммония проводили добавлением к супернатанту порошка NH_2SO_4 до концентрации 45% от насыщения. Для формирования осадка раствор оставляли в холодильнике (плюс 2-6°C) на ночь. Осадок отделяли центрифугированием (15 мин, 10000 об/мин), растворяли в минимальном растворе 20 мМ Na-фосфатного буферного раствора с 0,15 М NaCl, рН 7,2 (ФСБ) и затем диализовали приблизительно 16 часов при плюс 2-6°C против 1,5 М глицина с 3 М NaCl, рН 8,6. Диализат с помощью насоса наносили со скоростью 1 мл/мин на колонку (10x50 мм), заполненную 5 мл сорбента с белком А и уравновешенную

тем же буферным раствором. После сорбции сорбент промывали 50 мл этого же буферного раствора. Элюцию проводили 20 мл 20 мМ натрий-цитратного буферного раствора, pH 4,0 для элюции антител с изотипом IgG2. Элюат, содержащий антитела, собирали в емкость, контролируя процесс выхода белка с колонки с помощью УФ детектора хроматографа. Далее антитела концентрировали осаждением сульфатом аммония. Осаждение сульфатом аммония проводили добавлением к супернатанту порошка NH_2SO_4 до концентрации 45% от насыщения. Для формирования осадка раствор оставляли в холодильнике (плюс 2-6°C) на ночь. Осадок отделяли центрифугированием (15 мин, 10000 об/мин), растворяли в минимальном растворе 20 мМ Na-фосфатного буферного раствора с 0,15 М NaCl, pH 7,2 (ФСБ) и затем диализовали приблизительно 16 часов при плюс 2-6°C против 20 мМ Na-фосфатного буферного раствора с 0,15 М NaCl, pH 7,2. После диализа определяли содержание белка методом спектрофотометрии при длине волны 280 нм, используя молярный коэффициент экстинкции для мышиных IgG.

15 Пример 1.5. Оценка чистоты полученного препарата МАТ ТШК14.

Оценку чистоты и гомогенности полученных препаратов антител проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в не восстанавливающих и восстанавливающих условиях. По данным электрофореза в не восстанавливающих условиях препарат МАТ ТШК14 демонстрирует одну мажорную зону, молекулярного веса более 160 кДа, что соответствует молекулярному весу иммуноглобулинов и свидетельствует о чистоте препарата. Результаты электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях свидетельствует о том, что антитело ТШК14 характеризуется типичным для иммуноглобулинов класса G наличием двух цепей - тяжелой и легкой, с молекулярными массами около 50 и 25 кДа соответственно (Фиг. 1).

25 Пример 2. Исследование свойств моноклональных антител ТШК14. Оценка эффективности связывания моноклонального антитела ТШК14 к рекомбинантному антигену VEGFR-1

Для определения связывания моноклональных антител ТШК14 к антигену-мишени VEGFR-1 применяли твердофазный вариант иммуноферментного анализа. В качестве твердой фазы использовали полистироловые 96-ти луночные планшеты Corning (Costar). В качестве антигена для иммобилизации твердой фазы использовали рекомбинантные белки VEGFR-1 человека (RPB818Hu01, Cloud-Clone Corp.) и мыши (*Mus musculus*, Ser27~Val329, Cloud-Clone Corp. RPB818Mu01) в концентрации 2,5 мкг/мл. Адсорбцию антигена проводили в 20 мМ боратном буфере с pH 8,0, содержащем 0,15 М NaCl, в течение 20 часов во влажной камере при +4°C. Моноклональные антитела ТШК14 наносили в 100 мкл промывочного буфера (фосфатно-солевой буфер, pH 7,4, 0,05% Tween-20), содержащего 1 мг/мл БСА с последовательным разбавлением антител в 2 раза, начиная со стартовой концентрации 2 мкг/мл. Планшеты инкубировали 1 час при 37°C и перемешивании. По окончании инкубации проводили отмывку не связавшихся с антигеном антител промывочным буфером и вносили в лунки раствор конъюгированных с пероксидазой хрена иммуноглобулинов козы к иммуноглобулинам мыши (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:20.000. Планшеты инкубировали 1 час при 37°C и перемешивании. По окончании инкубации проводили отмывку не связавшихся антител промывочным буфером. Проявление связавшихся вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, проводили с помощью раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Реакцию останавливали добавлением 1М серной кислоты при этом ТМБ приобретает желтый цвет с максимальной поглощающей способностью

при 450 нм. Количество преобразованного ТМВ детектировали с помощью планшетного ридера EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer, USA) при длине волны 450 нм. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.4.0., фиттируя зависимость оптической плотности при длине волны 450 нм (OD₄₅₀) от концентрации МАТ кривой Михаэлиса-Ментена [https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg_michaelis_menten_enzyme.htm] и определяя константу связывания K_m как концентрацию МАТ, необходимую для достижения половинной максимальной OD₄₅₀.

Иммуноферментный анализ показал, что моноклональное антитело ТШК14 против человеческого VEGFR-1 обладает связывающей активностью (аффинность) с человеческим VEGFR-1 (K_m<0,5 мкМ), при этом также демонстрирует связывающую активность с мышинным антигеном VEGFR-1 (K_m<5 мкМ). Результаты исследований приведены на Фиг. 2.

Для определения константы связывания K_d моноклонального антитела ТШК14 с человеческим и мышинными антигенами VEGFR-1 проводили измерение параметров взаимодействия полученных МАТ ТШК14 с VEGFR-1 методом биослойной интерферометрии (BLI) на приборе Octet® RED 96 Forte Bio (Sartorius) с использованием сенсоров Octet® Anti-Mouse IgG Fc Capture (АМС) и двух рекомбинантных белков VEGFR-1: рекомбинантный VEGFR-1 человека (RPB818Hu01, Cloud-Clone Corp.) и рекомбинантный мышинный VEGFR-1 (RPB818Mu01, Cloud-Clone Corp.). По результатам измерения кинетических свойств связывания антитела ТШК14 с человеческим и мышинным рекомбинантными антигенами VEGFR-1 была определена K_d=4.02·10⁻¹² М и K_d=5.85·10⁻⁹ М соответственно.

Пример 3. Исследование свойств моноклональных антител ТШК14

Анализ связывания антител ТШК14 с нативным антигеном VEGFR-1 на поверхности опухолевых клеток производили методом проточной цитометрии.

Для этого клетки линий рака кишечника человека Hutu-80 и LoVo, фиксировали 4% формальдегидом. Далее клетки инкубировали с МАТ ТШК14 или коммерческими МАТ (#BF0131 FLT1 Antibody, Affinity Biosciences) в количестве 2 мкг на 10Е6 клеток. Окрашивали вторичными антителами anti-mouse-Alexa488 (17c01220, Hansa BioMedLife Science, Эстония, 1нг/мл) 1 ч, 4°С и визуализировали на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США) при лазере 480 нм, накапливая 20000 событий.

На Фиг. 3 показаны данные проточной цитометрии при визуализации VEGFR-1 МАТ ТШК14 и коммерческими МАТ (#BF0131 FLT1 Antibody, Affinity Biosciences) на поверхности клеток линий рака кишечника человека Hutu-80 (Фиг. 3А) и LoVo (Фиг. 3Б). Полученные цитограммы распределения интенсивности флюоресценции клеток фактически совпадают для тестируемых МАТ ТШК14 и коммерчески доступных для научных исследований антител к VEGFR-1 человека (#BF0131 FLT1 Antibody, Affinity Biosciences). Таким образом, результаты приведенные на Фиг. 3 свидетельствуют о том, что тестируемые антитела специфически связались с антигенными детерминантами на поверхности исследуемых клеток, кроме того, эффективность связывания нативного рецептора VEGFR-1 моноклональными антителами ТШК14 не уступает коммерчески доступным моноклональным антителам (#BF0131 FLT1 Antibody, Affinity Biosciences).

Пример 4: Оценка антипролиферативного действия МАТ ТШК14 на клеточных моделях

Чтобы оценить рост клеток линий рака кишечника человека и мыши при блокировании VEGFR-1 моноклональными антителами ТШК14 пролиферация

клеточных линий Hutu-80 (рак кишечника, человек) и СТ-26 (рак кишечника, мышь) была проанализирована с использованием инструмента xCELLigence DP (ACEA Biosciences), позволяющего детектировать клеточный индекс в режиме реального времени. Представленные на Фиг. 4 графики роста клеток в отсутствие или присутствии антител ТШК14 в культуральной среде демонстрируют, что использование антител ТШК14 значительно подавляет рост опухолевых клеток обеих тестируемых линий. Таким образом, полученные МАТ ТШК14 ингибируют клеточный ответ, который следует за связыванием лигандов VEGF-A и/или P1GF с рецептором, замедляя темп пролиферации ряда опухолевых клеток кишечника *in vitro*. Результаты указывают на перспективность использования терапевтического блокирования мишени VEGFR-1 для лечения рака кишечника человека [Dakowicz D., Zajkowska M., Mroczko B. Relationship between VEGF Family Members, Their Receptors and Cell Death in the Neoplastic Transformation of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022. V. 23. №6. P. 3375. DOI: 10.3390/ijms23063375].

Пример 5: Противоопухолевое действие МАТ ТШК14 на моделях животных

С целью оценки противоопухолевого действия антитела ТШК14 мышам линии Balb/DВА подкожно вводили клетки СТ-26 (рак кишечника, мышь) из культуры в количестве 5×10^5 клеток на мышь в объеме 0,1 мл. Мышей после инъекции опухоли разбивали на три группы по 6 животных в группе. Двум разным группам животных на третий день после инъекции опухолевых клеток и далее с частотой раз в три дня внутривенно вводили МАТ ТШК14 в количестве 1,0 мг/мышь или 3,5 мг/мышь в объеме 0,1 мл физиологического раствора. Контрольной группе животных вводили только физиологический раствор в том же режиме. Эффективность действия МАТ ТШК14 оценивалась по размеру опухолевого узла, измеряемого на 25 день наблюдений, а также по выживаемости животных. Результаты эксперимента представлены на Фиг. 5. Так средний объем опухоли на 25 день терапии в составил: а) в группе контроля, не получавшей лечения - $8,5 \text{ см}^3$; б) в группе, получавшей системное введение МАТ ТШК14 (1 мг/мышь) - $5,7 \text{ см}^3$; в) группе, получавшей системное введение МАТ ТШК14 (3,5 мг/мышь) средний объем опухолевого узла был в 2 раза меньше чем в контрольной группе и составлял $3,7 \text{ см}^3$ (Фиг. 5А). Таким образом, системное введение МАТ ТШК14 в дозе 1 мг/мышь и 3,5 мг/мышь каждые 3 дня приводило к статистически значимому ($p < 0.05$) подавлению роста опухолевых трансплантатов СТ-26 (Фиг. 5А). Средняя продолжительность жизни после прививки опухолевых клеток составила: а) в группе контроля, не получавшей лечения - 23 дня; б) в группе, получавшей системное введение МАТ ТШК14 (1 мг/мышь) - 37 дней; в) МАТ ТШК14 (3,5 мг/мышь) - 32 дня (Фиг. 5Б). Таким образом, полученные в МАТ ТШК14 к рецептору VEGFR-1 уменьшают темп роста опухолевого узла *in vivo* и продлевают выживаемость мышей с перевитыми клетками карциномы кишечника СТ-26. Полученные данные свидетельствуют о том, что МАТ ТШК14 обладают выраженным противоопухолевым эффектом.

Пример 6. Определение нуклеотидных последовательностей и анализ генов переменных областей легкой и тяжелой цепей мышинового моноклонального антитела ТШК14

Рибонуклеиновую кислоту (РНК) из клеток клона ТШК14 выделяли с помощью набора GeneJET RNA Purification kit (Thermo scientific, Lithuania) и затем на матрице данной РНК методом обратной транскрипции получали к ДНК с помощью праймера oligo(dT)18 и обратной транскриптазы MMLV (ЗАО «Евроген», Россия) по инструкции изготовителя. Далее с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием известных наборов праймеров и высокоточной смеси ДНК- полимераз

High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo scientific, Lithuania) получали фрагменты ДНК, кодирующие переменные участки тяжелой и легкой цепей антитела. ПЦР-продукты переменных фрагментов легкой и тяжелой цепей иммуноглобулинов анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле. Полосы продуктов ожидаемого размера в районе 450 пар оснований вырезали из геля, элюировали с помощью набора реагентов для выделения ДНК из агарозного геля (ЗАО «Евроген», Россия). После этого полученные ПЦР-продукты анализировали секвенированием. Секвенирование проводили на капиллярном секвенаторе AB3500 (Applied Biosystems, США) с помощью коммерческого набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), очистку образцов перед анализом проводили с помощью набора BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США).

Найденные последовательности полученных фрагментов ДНК, кодирующих переменные области тяжелой и легкой цепей моноклонального антитела ТШК14 представлены в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно.

Функциональный и структурный анализ переменных фрагментов легкой и тяжелой цепи исследуемого антитела, проведенный с помощью инструмента IMGT/V-QUEST и базы данных IMGT [www.imgt.org], показал расположение рамочных и образующих комплементарность участков (CDR-участков). Найденные последовательности CDR-участков представлены в SEQ ID NO: 3-8.

Таким образом, заявляемые антитела против рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 человека (VEGFR-1), являются новыми моноклональными мышиными антителами МАТ ТШК14 с полученной аминокислотной последовательностью, имеющими изотип IgG2a и обладающими при этом специфичностью и высокой аффинностью к VEGFR-1 человека ($K_D=4.02 \cdot 10^{-12}$ М) и мыши ($K_d=5.85 \cdot 10^{-9}$ М), обеспечивая подавление роста опухолевых клеток и возможность использования изобретения в доклинических исследованиях для лечения рака кишечника человека

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение №075-15-2021-1360 от 12.10.2021.

```

<?xml version="1.0" encoding="ISO-8859-1"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing SYSTEM "ST26SequenceListing_V1_3.dtd" PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN">
<ST26SequenceListing productionDate="2024-11-09" softwareVersion="2.3.0"
softwareName="WIPO Sequence" fileName="ТШК14.xml" dtdVersion="V1_3"
originalFreeTextLanguageCode="ru">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>2023135666/10 (077961)</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-12-28</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="ru">Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Петербургский институт ядерной физики им. В. П. Константинова Национального
исследовательского центра «Курчатовский институт»</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>Petersburg Nuclear Physics Institute named by В.П.
Konstantinov of National Research Centre "Kurchatov Institute" (NRC "Kurchatov
Institute" - PNPI)</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="ru">Антитела против рецептора фактора роста

```

```

эндотелия сосудов 1 человека (VEGFR-1)</InventionTitle>
<SequenceTotalQuantity>8</SequenceTotalQuantity>
<SequenceData sequenceIDNumber="1">
<INSDSeq>
5 <INSDSeq_length>333</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature><INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
10 <INSDFeature_location>1..333</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
15 </INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q2">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
20 </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>caggttcagctgcagcagctctggagctgagctgatgaagcctggggcctcagtgaagatatacct
Gcaaggctactggctacacattcagtagctactggatagagtggttaaagcagaggcctggacatggccttgagtggattgg
25 Agagattttacctggaagtggtagtactaactacaatgagaagttcaagggcaaggccacattcactgcagatacatcctcc
Aacacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctgccgtctattactgtgcaagaataagctggggccaag
ggactctggctcactgtctctgca</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
30 <SequenceData sequenceIDNumber="2">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>336</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
35 <INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..336</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
40 <INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q4">
45 <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>

```

```

</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gatgttttgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtccttgagatcatgcctccatct
Cttgcagatctagtcagagcattgtacatagtaatggaaacacctattagaatggtacctgcagaaaccaggccagtctcc
5 Aaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctgggggtcccagacaggttcagtgggcagtgatcagggacagatttc
Aactcaagatcagcagagtggaggctgcggatctgggagtttattactgctttcaaggttcacatgttccattcacgttcg
gctcggggacaaagttggaaataaaa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
10 <SequenceData sequenceIDNumber="3">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
15 <INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
20 <INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q6">
25 <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
30 </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GYTFSSYW</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
35 <INSDSeq>
<INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
40 <INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
45 <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q8">

```

```

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
5 </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ILPGSGST</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
10 <SequenceData sequenceIDNumber="5">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>4</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
15 <INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..4</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
20 <INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q10">
25 <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
30 </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ARIS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
35 <INSDSeq>
<INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
40 <INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
45 <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q12">

```

```

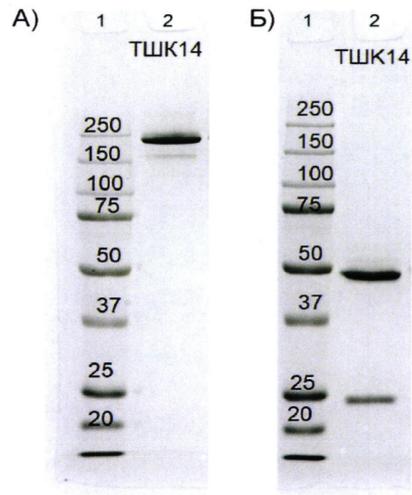
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
5 </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSIVHSNGNTY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
10 <SequenceData sequenceIDNumber="7">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length/>
<INSDSeq_moltype/>
<INSDSeq_division/>
15 <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
<INSDSeq>
20 <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
25 <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
30 <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier><INSDQualifier id="q16">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
35 </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>FQGSHVPFT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
40 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>

```

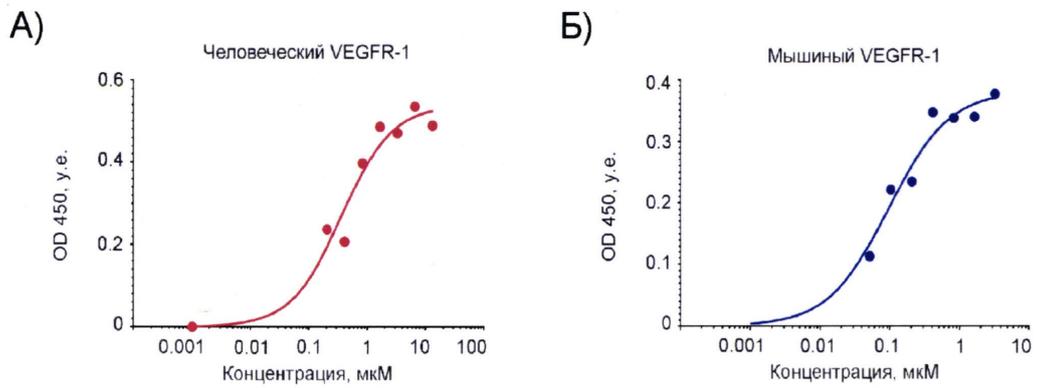
(57) Формула изобретения

45 Моноклональное антитело, специфически связывающееся с рецептором фактора роста эндотелия сосудов 1 VEGFR-1 человека, содержащее переменный домен тяжелой цепи, кодируемый последовательностью SEQ ID NO: 1, переменный домен легкой цепи, кодируемый последовательностью SEQ ID NO: 2, и гиперпеременные участки тяжелой и легкой цепей с последовательностями SEQ ID NO: 3-8.

1

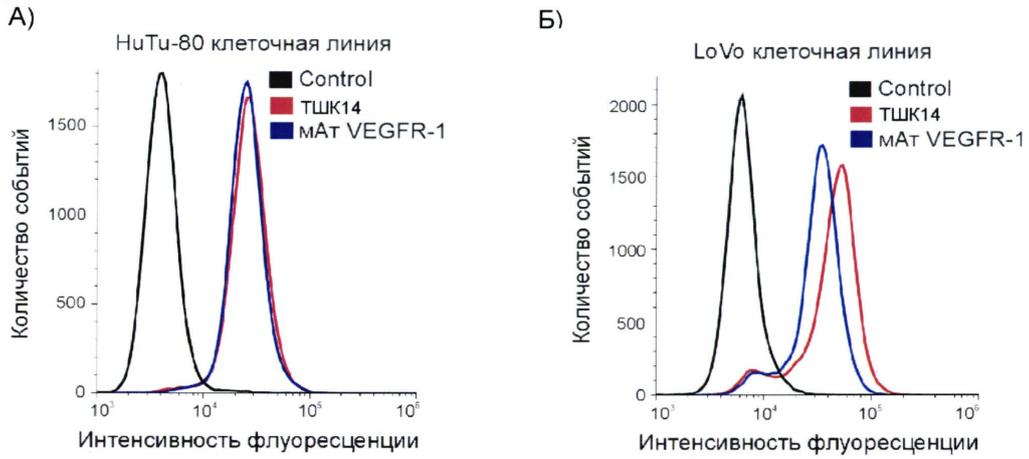


Фиг. 1

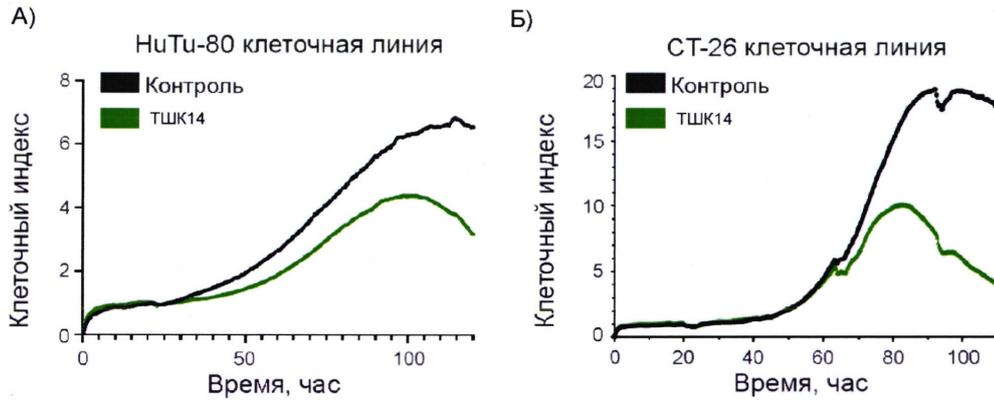


Фиг. 2

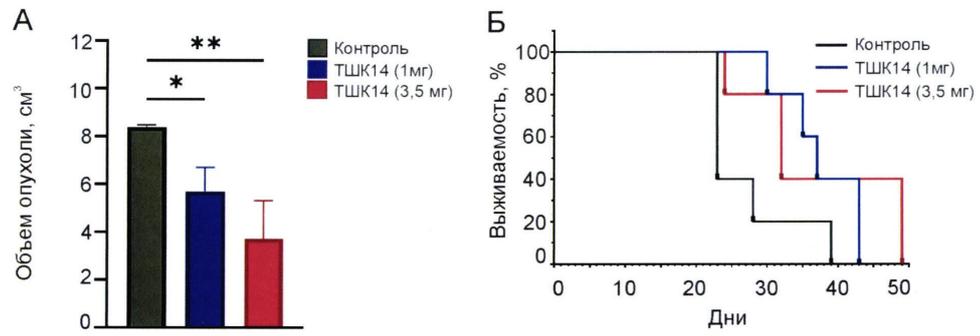
2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5