



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
G01N 33/53 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017128342, 08.08.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
08.08.2017

Дата регистрации:  
07.03.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 08.08.2017

(45) Опубликовано: 07.03.2018 Бюл. № 7

Адрес для переписки:

630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14,  
НИИФКИ

(72) Автор(ы):

Сенников Сергей Витальевич (RU),  
Киреев Федор Дмитриевич (RU),  
Лопатникова Юлия Анатольевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение  
"Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической  
иммунологии" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: US 2010/0267934 A1, 21.10.2010.  
LOPATNIKOVA JA., et al., Analysis of the  
levels of tumour necrosis factor (TNF),  
autoantibodies to TNF, and soluble TNF  
receptors in patients with rheumatoid  
arthritis.Scand J Rheumatol. 2013;42(6):429-32.  
doi: 10.3109/03009742.2013.794471. Epub 2013  
Aug 28. SENNIKOV SV., et al., Purification of  
human (см. прод.)

(54) Способ выделения аутоантител подклассов иммуноглобулина G к иммунорегуляторному цитокину фактору некроза опухоли

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и касается способа выделения подклассов иммуноглобулина G (IgG) аутоантител к иммунорегуляторному цитокину фактору некроза опухоли (TNF), заключающегося в получении общей фракции IgG аффинной хроматографией с использованием сорбента Protein G Sepharose с последующей нейтрализацией, объединением и диализом IgG, очистке полученной фракции IgG от примеси TNF. При этом выделение подклассов IgG производят из фармацевтического препарата иммуноглобулина для внутривенного введения, после получения фракции IgG осуществляют ее очистку от примеси TNF ультрафильтрацией с использованием центрифужных фильтров, затем проводят этап выделения антител IgG3 и

получения смеси IgG1, IgG2, IgG4 аффинной хроматографией; затем выделяют антитела IgG1 многократной негативной аффинной хроматографией с последующим объединением и диализом, затем выделяют антитела IgG2 многократной негативной аффинной хроматографией с последующим объединением и диализом, затем проводят очистку антител IgG1 и IgG2 от примеси IgG4 негативной аффинной хроматографией, после чего проводят выделение специфических аутоантител к TNF подклассов IgG1, IgG2, IgG3 аффинной хроматографией с последующей нейтрализацией, объединением и диализом. Изобретение обеспечивает получение чистых фракций аутоантител к TNF подклассов IgG1, IgG2 и IgG3. 1 пр., 1 табл.

(56) (продолжение):

immunoglobulin G autoantibodies to tumor necrosis factor using affinity chromatography and magnetic separation. *J Immunol Methods*. 2013 Apr 30;390(1-2):92-8. doi: 10.1016/j.jim.2013.01.012. Epub 2013 Feb 4. HORSFALL AC., et al., Purification of human autoantibodies from cross-linked antigen immunosorbents. *J Immunol Methods*. 1987 Nov 23;104(1-2):43-9. ROSENAU BJ., et al., Autoantibodies to tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2009 Apr;36(4):753-6. doi: 10.3899/jrheum.080587. Epub 2009 Feb 27.

R U  
2 6 4 6 8 0 7  
C 1

R U  
2 6 4 6 8 0 7  
C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*G01N 33/53* (2006.01)

(21)(22) Application: **2017128342, 08.08.2017**

(24) Effective date for property rights:  
**08.08.2017**

Registration date:  
**07.03.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **08.08.2017**

(45) Date of publication: **07.03.2018** Bull. № 7

Mail address:  
**630099, g. Novosibirsk, ul. Yadrinsevskaya, 14,  
NIIFKI**

(72) Inventor(s):

**Sennikov Sergej Vitalevich (RU),  
Kireev Fedor Dmitrievich (RU),  
Lopatnikova Yuliya Anatolevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
nauchnoe uchrezhdenie  
"Nauchno-issledovatel'skij institut  
fundamentalnoj i klinicheskoy immunologii"  
(RU)**

(54) **METHOD FOR ISOLATING AUTOANTIBODIES OF IMMUNOGLOBULIN G SUBCLASSES TO IMMUNOREGULATORY CYTOKINE TUMOR NECROSIS FACTOR**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine and concerns a method for isolating subclasses of immunoglobulin G (IgG) autoantibodies against immunoregulatory cytokine tumor necrosis factor (TNF), which consists in obtaining a total IgG fraction by affinity chromatography using the Protein G Sepharose sorbent, followed by neutralization, integration and dialysis of IgG, purification of the resulting fraction of IgG from the TNF impurity. In this case, isolation of IgG subclasses is made from immunoglobulin pharmaceutical preparation for intravenous administration, after obtaining the IgG fraction, it is purified from the TNF impurity by ultrafiltration using centrifugal filters, then, step of isolating IgG3 antibodies and obtaining a mixture of

IgG1, IgG2, IgG4 by affinity chromatography is carried out; then IgG1 antibodies are isolated by repeated negative affinity chromatography, followed by pooling and dialysis, then IgG2 antibodies are isolated by multiple negative affinity chromatography followed by pooling and dialysis, then IgG1 and IgG2 antibodies are purified from the IgG4 impurity by negative affinity chromatography, followed by isolation of specific autoantibodies to the TNF subclasses IgG1, IgG2, IgG3 by affinity chromatography, followed by neutralization, dialysis.

EFFECT: invention provides obtaining pure fractions of autoantibodies to TNF subclasses IgG1, IgG2 and IgG3.

1 cl, 1 ex, 1 tbl

RU 2 646 807 C1

RU 2 646 807 C1

Изобретение относится к иммунологии и биотехнологии, а именно к способам выделения аутоантител подклассов иммуноглобулина G к фактору некроза опухоли (TNF) из фармацевтического препарата иммуноглобулина для внутривенного введения.

Аутоантитела к цитокинам присутствуют как у здоровых индивидов, так и у больных различными нозологиями. Наличие различных антицитокиновых аутоантител в норме свидетельствует о том, что они участвуют в поддержании гомеостаза, стабилизируя воспаление и предотвращая повреждение тканей [Nielsen С.Н., Bendtzen К. Immunoregulation by naturally occurring and disease-associated autoantibodies: binding to cytokines and their role in regulation of T-cell responses. // Adv Exp Med Biol. - 2012. - V. 750. - P. 116-32].

В основном исследование содержания аутоантител к цитокинам проводится при измерении содержания общего иммуноглобулина G (IgG), специфичного к определенным молекулам, однако не менее важным является и содержание отдельных подклассов антицитокиновых аутоантител. Кроме того, существуют различия в свойствах каждого из подклассов антител класса IgG [Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. // Front Immunol. - 2014. - V. 20. - N. 5. - P. 520]. В ряде работ [Sennikov S.V., Golikova E.A., Kireev F.D., Lopatnikova J.A. Purification of human immunoglobulin G autoantibodies to tumor necrosis factor using affinity chromatography and magnetic separation. // J Immunol Methods. - 2013. - V. 390. - N. 1-2. - P. 92-8. Golikova E.A., Lopatnikova J.A., Kovalevskaya-Kucheryavenko T.V., Nepomnyashih V.M., Sennikov S.V. Levels of TNF, TNF autoantibodies and soluble TNF receptors in patients with bronchial asthma. // J Asthma. - 2013. - V. 50. - N. 7. - P. 705-11. Lopatnikova J.A., Golikova E.A., Shkaruba N.S., Sizikov A.E., Sennikov S.V. Analysis of the levels of tumour necrosis factor (TNF), autoantibodies to TNF, and soluble TNF receptors in patients with rheumatoid arthritis. // Scand J Rheumatol. - 2013. - V. 42. - N. 6. - P. 429-32] показаны изменения в распределении подклассов IgG аутоантител к TNF при ревматоидном артрите и бронхиальной астме.

Авторами обнаружено увеличение содержания аутоантител подклассов IgG2, IgG3 и IgG4 к TNF в сыворотках крови больных ревматоидным артритом и бронхиальной астмой в стадии обострения по сравнению со здоровыми индивидами, а также показано снижение содержания аутоантител подклассов IgG2 и IgG4 при ответе на терапию у больных ревматоидным артритом и снижение содержания аутоантител подклассов IgG2 и IgG4 и повышение уровня аутоантител подкласса IgG1 у больных бронхиальной астмой при переходе от неконтролируемого к контролируемому течению заболевания [Lopatnikova J.A., Golikova E.A., Shkaruba N.S., Sizikov A.E., Sennikov S.V. Analysis of the levels of tumour necrosis factor (TNF), autoantibodies to TNF, and soluble TNF receptors in patients with rheumatoid arthritis. // Scand J Rheumatol. - 2013. - V. 42. - N. 6. - P. 429-32. Golikova E.A., Lopatnikova J.A., Kovalevskaya-Kucheryavenko T.V., Nepomnyashih V.M., Sennikov S.V. Levels of TNF, TNF autoantibodies and soluble TNF receptors in patients with bronchial asthma. // J Asthma. - 2013. - V. 50. - N. 7. - P. 705-11]. Полученные данные свидетельствуют, что различные подклассы IgG могут участвовать в патогенезе и, вероятно, обладают разной активностью в отношении медиатора. Для получения экспериментальных подтверждений этого необходимо изучить влияние подклассов аутоантител к TNF на реализацию его биологических эффектов. Существуют разные подходы к оценке биологических эффектов аутоантител к цитокинам. В большинстве исследований проводится оценка влияния кратных разведений сывороток больных различными нозологиями на биологическую активность цитокинов. Однако такой подход не позволяет дифференцировать эффекты аутоантител и растворимых рецепторов к цитокинам.

В литературе приводится достаточное количество отработанных протоколов выделения IgG человека из сыворотки крови, однако сведения о подходах к разделению IgG на подклассы в литературе крайне скудны. Все подклассы обладают высокой аффинностью к Protein G, поэтому использование аффинной колонки с данным сорбентом позволяет выделить все четыре подкласса IgG. При этом аффинность связывания с Protein A у разных подклассов IgG различается. Все подклассы, кроме IgG3, связываются с Protein A с высокой аффинностью. Вследствие низкой аффинности IgG3 к Protein A возможно отделить его от трех других подклассов [Kronvall G., Williams R.C. Jr. Differences in anti-protein A activity among subgroups. // *J Immunol.* - 1969. - V. 103. - N. 6. - P. 1405-10. Sviatenko O.V., Gorbatiuk O.B., Vasylychenko O.A. Application of immunoglobulin-binding proteins A, G, L in the affinity chromatography. // *Biotechnologia Acta.* - 2014. - V. 7. - N. 2. - P. 34-45].

Разделение IgG1, IgG2 и IgG4 может проводиться с учетом их различной аффинности к Protein A с использованием градиента pH в процессе хроматографии. Однако полное их разделение невозможно вследствие перекрывания интервалов pH диссоциации комплексов различных подклассов иммуноглобулинов с Protein A [Nikolayenko I.V., Galkin O.Yu., Grabchenko N.I., Spivak M.Ya. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis // *Ukrainica Bioorganica Acta.* - 2005. - V. 2. - P. 3-11. Leblebici P., Leblebici M.E., Ferreira-da-Silva F., Rodrigues A.E., Pais L.S. Separation of human immunoglobulin G subclasses on a protein A monolith column. // *J Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci.* - 2014. - V. 962. - P. 89-93]. В других работах для выделения чистых фракций подклассов IgG использовались сорбенты, полученные при связывании подкласс-специфических моноклональных антител с сефарозой [Bird P., Lowe J., Stokes R.P., Bird A.G., Ling N.R., Jefferis R. The separation of human serum IgG into subclass fractions by immunoaffinity chromatography and assessment of specific antibody activity. // *J Immunol Methods.* - 1984. - V. 71. - N. 1. - P. 97-105]. В работе Bird et al. использование позитивной и негативной хроматографии позволило выделить отдельные подклассы IgG из поликлонального IgG с содержанием примеси других подклассов менее 1%. Несмотря на то что в литературе описано получение препаратов IgG антицитокиновых аутоантител, к настоящему времени не предложено подходов к препаративному выделению подклассов IgG специфических аутоантител к цитокинам.

Таким образом, данные литературы об изменении содержания подклассов аутоантител к цитокинам при патогенетических состояниях свидетельствуют о возможных различиях в их биологических функциях. При этом в литературе последних лет не представлено работ, связанных с получением отдельных подклассов IgG человека аутоантител к цитокинам. Поэтому представлялось актуальным разработать современный методический подход для получения фракций подклассов аутоантител к TNF из препарата иммуноглобулина, включающий гель-фильтрацию, позитивную и негативную аффинную хроматографию и ультрафильтрацию по молекулярной массе для получения фракций подклассов аутоантител к TNF из препарата иммуноглобулина.

Известен способ разделения подклассов IgG путем жидкостной хроматографии с использованием в качестве твердой фазы пористого геля с пределом исключения выше молекулярной массы иммуноглобулина G и, в качестве подвижной фазы, буферного раствора со специфической ионной силой. В данном подходе применяется пористый гель, предпочтительно неорганической природы, со средним объемом частиц менее 50 мкм, несущий гидрофильные группы, такие как гидроксильные, и буферные растворы с ионной силой от 0.1 до 2.0 М, предпочтительно от 0.1 М до 1.0 М. Подход основан на различиях в гидрофобном взаимодействии геля и подклассов IgG в процессе

жидкостной хроматографии, которые обуславливаются разным аминокислотным составом  $\gamma$ -цепей, определяющих принадлежность к соответствующему подклассу. В данном случае нет необходимости изменения pH элюирующего буфера, что обуславливает отсутствие влияния агрессивной среды pH на биологическую активность выделяемых антител (JPS6419024, А61К 39/395, 1989).

Недостатком данного способа является ограниченность его использования выделением подклассов IgG мыши. Кроме того, не указывается степень чистоты полученных фракций различных подклассов.

Наиболее близким к заявляемому является способ выделения фракций аутоантител к иммунорегуляторному цитокину фактору некроза опухоли (TNF) из сыворотки крови человека с использованием комплекса процедур аффинной хроматографии, проводят выделение антител класса IgG с использованием аффинного сорбента Protein G Sepharose, после проведения элюции, полученные фракции аутоантител нейтрализуют, объединяют и диализуют, далее фракции аутоантител наносят на колонку со связанным с TNF аффинным сорбентом, после проведения элюции полученные фракции аутоантител к TNF нейтрализуют, объединяют и диализуют, после этого проводят их магнитную сепарацию с использованием магнитных частиц, причем магнитные частицы, покрытые стрептавидином, со-инкубируют с мечеными биотином поликлональными антителами к TNF и полученный комплекс инкубируют с фракциями аутоантител к TNF, затем собирают надосадочную жидкость, содержащую очищенные фракции аутоантител (RU 2501008, G01N 33/00, 2013).

В описанном способе аутоантитела класса IgG к TNF выделяют из сыворотки крови человека с использованием комплекса хроматографических процедур и процедуры магнитной сепарации. Используются следующие хроматографические сорбенты: Bio-Gel P6 DG (Bio-Rad, США), Protein G Sepharose Fast Flow (GE Life Sciences, Швеция) и Affi-Gel 15 (Bio-Rad, США), связанный с TNF. Магнитную сепарацию проводят с использованием магнитных частиц, покрытых стрептавидином, и поликлональных антител к TNF, меченых биотином.

Однако данным способом можно получить общую фракцию класса IgG аутоантител к TNF, включающую все четыре подкласса: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Для оценки биологической активности аутоантител к TNF, относящихся к конкретному подклассу IgG, требуется выделение отдельных подклассов IgG.

Задачей настоящего изобретения является создание эффективного способа выделения аутоантител подклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 к иммунорегуляторному цитокину TNF.

Поставленная задача решается тем, что в способе выделения подклассов иммуноглобулина G (IgG) аутоантител к иммунорегуляторному цитокину фактору некроза опухоли (TNF), заключающемся в получении общей фракции IgG аффинной хроматографией с использованием сорбента Protein G Sepharose с последующей нейтрализацией, объединением и диализом IgG, очистке полученной фракции IgG от примеси TNF, выделение подклассов IgG производят из фармацевтического препарата иммуноглобулина для внутривенного введения, после получения фракции IgG осуществляют ее очистку от примеси TNF ультрафильтрацией с использованием центрифужных фильтров, затем проводят этап выделения антител IgG3 и получения смеси IgG1, IgG2, IgG4 аффинной хроматографией с использованием сорбента Protein A Sepharose, причем после выделения IgG3 проводят элюцию смеси IgG1, IgG2, IgG4 цитратным буфером с pH 3.0, с последующей нейтрализацией, объединением и диализом; затем выделяют антитела IgG1 многократной негативной аффинной хроматографией с использованием сорбента анти-IgG2 Sepharose с последующим объединением и

диализом, затем выделяют антитела IgG2 многократной негативной аффинной хроматографией с использованием сорбента анти-IgG1 Sepharose с последующим объединением и диализом, затем проводят очистку антител IgG1 и IgG2 от примеси IgG4 негативной аффинной хроматографией с использованием сорбента анти-IgG4 Sepharose, после чего проводят выделение специфических аутоантител к TNF подклассов IgG1, IgG2, IgG3 аффинной хроматографией с использованием сорбента Affi Gel 15-TNF с последующей нейтрализацией, объединением и диализом.

Сущность предлагаемого изобретения заключается в следующем.

Для переноса иммуноглобулинов препарата «Имуноглобулин человека нормальный, раствор для внутривенного введения» в рабочий буфер используют колонку с сорбентом Bio-Gel P6 DG. Далее для выделения антител класса IgG белки, собранные с колонки с сорбентом Bio-Gel P6 DG, наносят на колонку с аффинным сорбентом Protein G Sepharose 4 Fast Flow. При проведении элюции полученные фракции аутоантител нейтрализуют, объединяют и диализуют. Далее проводят очистку фракции общего IgG от аутоантигенов методом ультрафильтрации на центрифужных фильтрах Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices. После ультрафильтрации фракции IgG нейтрализуют, объединяют и диализуют. Для выделения IgG3 фракцию общего IgG наносят на колонку HiTrap Protein A HP 1 ml, содержащую аффинный сорбент Protein A Sepharose High Performance.

Несвязавшуюся фракцию, которая представляет собой очищенный IgG3, собирают и проводят элюцию связанной фракции, содержащей IgG1, IgG2 и IgG4. При проведении элюции полученные фракции нейтрализуют, объединяют и диализуют. Элюат с колонки HiTrap Protein A HP 1 ml используют для дальнейшего разделения подклассов IgG. Для выделения иммуноглобулинов подкласса IgG1 используют колонку с анти-IgG2-Sepharose 4B аффинным сорбентом. Несвязавшуюся фракцию собирают. Процедуру

хроматографии повторяют 7-кратно. Полученные фракции объединяют. Для выделения иммуноглобулинов подкласса IgG2 используют колонку с анти-IgG1-Sepharose 4 B аффинным сорбентом. Несвязавшуюся фракцию собирают. Процедуру хроматографии повторяют 7-кратно. Полученные фракции объединяют. Для очистки иммуноглобулинов подклассов IgG1 и IgG2 от примеси IgG4 используют колонку с анти-IgG4-Sepharose 4 B аффинным сорбентом. Несвязавшуюся фракцию собирают, полученные фракции объединяют. Для выделения специфических аутоантител к TNF фракции подклассов IgG1, IgG2 и IgG3 наносят на колонку с сорбентом Affi Gel 15-TNF. При проведении элюции полученные фракции аутоантител нейтрализуют, объединяют и диализуют.

Принципиальным отличием разработанного способа является выделение фракций аутоантител к TNF подклассов, относящихся к отдельным подклассам IgG1, IgG2 и IgG3, что позволит оценить их индивидуальную биологическую активность. Другим принципиальным отличием является использование процедуры ультрафильтрации для очистки фракции IgG от примеси TNF, для которой не требуются специфические антитела к медиатору. Для удаления контаминирующего цитокина была проведена очистка фракции общего IgG от аутоантигенов с молекулярной массой менее 100 kDa [Watanabe M., Uchida K., Nakagaki K., Kanazawa H., Trapnell B.C., Hoshino Y., Kagamu H., Yoshizawa H., Keicho N., Goto H., Nakata K. Anti-cytokine autoantibodies are ubiquitous in healthy individuals. // FEBS Lett. - 2007. - V. 581. - N. 10. - P. 2017-21]. Таким образом, все аутоантигены, как и TNF, проходили через мембрану и оказывались в фильтрате, а сверху мембраны оставалась фракция чистого IgG, не содержащего примесей аутоантигенов. По результатам иммуноферментного анализа до проведения ультрафильтрации содержание примеси TNF во фракции общего IgG составляло до 80 пг/мл, в то время как после ультрафильтрации было показано отсутствие примеси TNF.

Предлагаемое изобретение позволяет выделить чистые фракции аутоантител к TNF подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, очищенные от примеси самого TNF, в связи с чем полученные фракции могут быть использованы в различных биологических тестах, предполагающих использование аутоантител к TNF подклассов IgG1, IgG2 и IgG3.

5 Техническим результатом изобретения является получение чистых фракций аутоантител к TNF подклассов IgG1, IgG2 и IgG3.

Изобретение осуществляется следующим образом.

В качестве источника человеческого IgG используется фармацевтический препарат «Иммуноглобулин человека нормальный, раствор для внутривенного введения»  
10 (Микроген, Россия). Перенос иммуноглобулинов препарата в соответствующий буферный раствор, необходимый для дальнейших процедур аффинной очистки антител, осуществляется с помощью колонки с Bio-Gel P6 DG (Bio-Rad, США). Фракции с Bio-Gel P6 DG наносятся на колонку с аффинным сорбентом Protein G Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, США). Хроматографические процедуры проводятся в соответствии с  
15 инструкцией производителя. Используются следующие буферы: рабочий буфер - 20 mM фосфатно-солевой буфер (PBS) (pH 7.4), буфер для элюции - 0.1 M Gly-HCl/0.15 M NaCl (pH 2.5), буфер для удаления неспецифически связавшихся компонентов - 20 mM PBS, содержащий 0.1% Triton X-100 (pH 7.4). При проведении элюции полученную фракцию нейтрализуют до физиологических значений pH 1M Tris-HCl (pH 9.0).  
20 Выделенные фракции IgG объединяют и диализуют против 20 mM PBS (pH 7.4).

Для ультрафильтрации диализованные антитела IgG смешивают с буфером 0.1 M Gly-HCl/0.15 M NaCl (pH 2.5) в соотношении 1:9, инкубируют в течение 30 минут и вносят в центрифужный фильтр Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (Merck Millipore, Ирландия) для ультрафильтрации. Центрифугирование проводят при 6.000 G. Фракции  
25 IgG, не прошедшие через мембрану центрифужного фильтра, объединяют и диализуют против 20 mM PBS (pH 7.4). Определение примеси TNF во фракции IgG до и после проведения ультрафильтрации проводили методом иммуноферментного анализа с использованием набора «альфа-ФНО - ИФА - Бест» (Вектор-Бест, Россия).

Для выделения иммуноглобулинов подкласса IgG3 фракцию IgG наносят на колонку  
30 HiTrap Protein A HP 1 ml (GE Life Sciences, Швеция), содержащую аффинный сорбент Protein A Sepharose High Performance. Хроматографические процедуры проводятся в соответствии с инструкцией производителя. Собирают несвязавшуюся фракцию, которая представляет собой очищенный IgG3, и после падения оптической плотности до нулевого значения проводят элюцию связавшейся фракции, которая содержит IgG1, IgG2 и IgG4.  
35 Используются следующие буферы: рабочий буфер - 0.1 M PBS (pH 7.5), буфер для элюции - 0.1 M цитратный буфер (pH 3.0). При проведении элюции полученную фракцию нейтрализуют титрованием 1M Tris-HCl (pH 9.0) до физиологических значений pH. После сбора элюированной фракции с колонки удаляют неспецифически связавшиеся компоненты и проводят регенерацию колонки согласно рекомендациям производителя.  
40 Элюированную фракцию антител диализуют против 20 mM PBS (pH 7.4).

Для выделения IgG1 и IgG2 используют подкласс-специфичные моноклональные антитела, очищенные из следующих клонов: 2C11 (анти-IgG1), 52G1 (анти-IgG2) и 5C7 (анти-IgG4) (Биалекса, Россия). Связывание антител с аффинным сорбентом CNBr-activated Sepharose 4 B (GE Life Sciences, Швеция) и хроматографические процедуры  
45 проводят согласно инструкции производителя. Для выделения иммуноглобулинов подкласса IgG1 элюированную фракцию после хроматографии на колонке HiTrap Protein A HP 1 ml наносят на колонку с приготовленным аффинным сорбентом анти-IgG2-Sepharose 4B. Собирают несвязавшуюся фракцию и после снижения оптической



плотности до нулевого значения проводят элюцию связавшихся иммуноглобулинов, после чего удаляют неспецифически связавшиеся компоненты и проводят регенерацию колонки согласно рекомендациям производителя. Собранную несвязавшуюся фракцию вновь наносят на колонку с анти-IgG2-Sepharose 4В аффинным сорбентом и повторяют еще шесть аналогичных циклов хроматографии. Используются следующие буферы: рабочий буфер - 20 mM PBS (pH 7.4), буфер для элюции - 0.1 M Gly-HCl/0.15 M NaCl (pH 2.5), буферы для удаления неспецифически связавшихся компонентов - 0.1 M Tris-HCl/0.5 M NaCl, (pH 8.5) и 0.1 M натрия ацетат/0.5 M NaCl (pH 4.5).

Для выделения иммуноглобулинов подкласса IgG2 элюированную фракцию после хроматографии на колонке HiTrap Protein A HP 1 ml наносят на колонку с приготовленным аффинным сорбентом анти-IgG1-Sepharose 4 В. Собирают несвязавшуюся фракцию и после снижения оптической плотности до нулевого значения проводят элюцию связавшихся иммуноглобулинов, после чего удаляют неспецифически связавшиеся компоненты и проводят регенерацию колонки согласно рекомендациям производителя. Собранную несвязавшуюся фракцию вновь наносят на колонку с анти-IgG1-Sepharose 4В аффинным сорбентом и повторяют еще шесть аналогичных циклов хроматографии. Используются следующие буферы: рабочий буфер - 20 mM PBS (pH 7.4), буфер для элюции - 0.1 M Gly-HCl/0.15 M NaCl (pH 2.5), буферы для удаления неспецифически связавшихся компонентов - 0.1 M Tris-HCl/0.5 M NaCl, (pH 8.5) и 0.1 M натрия ацетат/0.5 M NaCl (pH 4.5).

Для очистки иммуноглобулинов подклассов IgG1 и IgG2 от примеси IgG4 несвязавшиеся фракции после хроматографии на колонках с анти-IgG2-Sepharose 4В и анти-IgG1-Sepharose 4В аффинными сорбентами, соответственно, наносят на колонку с анти-IgG4-Sepharose 4В аффинным сорбентом. Собирают несвязавшуюся фракцию и после снижения оптической плотности до нулевого значения проводят элюцию связавшихся иммуноглобулинов, после чего удаляют неспецифически связавшиеся компоненты и проводят регенерацию колонки согласно рекомендациям производителя. Используются следующие буферы: рабочий буфер - 20 mM PBS (pH 7.4), буфер для элюции - 0.1 M Gly-HCl/0.15 M NaCl (pH 2.5), буферы для удаления неспецифически связавшихся компонентов - 0.1 M Tris-HCl/0.5 M NaCl, (pH 8.5) и 0.1 M натрия ацетат/0.5 M NaCl (pH 4.5).

Порядок использования аффинных колонок для выделения подклассов IgG показан в таблице 1.

35

40

45

Выделяемый подкласс IgG	Последовательность использования хроматографических сорбентов
IgG1	Bio-Gel P6 DG → Protein G Sepharose → Protein A Sepharose → анти-IgG2 Sepharose (7X) → анти-IgG4 Sepharose
IgG2	Bio-Gel P6 DG → Protein G Sepharose → Protein A Sepharose → анти-IgG1 Sepharose (7X) → анти-IgG4 Sepharose
IgG3	Bio-Gel P6 DG → Protein G Sepharose → Protein A Sepharose

Таблица 1. Последовательность использования хроматографических сорбентов для выделения чистых фракций подклассов IgG.

Определение количества выделенных подклассов IgG и подтверждение отсутствия примеси других подклассов проведено методом иммуноферментного анализа с использованием набора «Подклассы IgG - ИФА - БЕСТ» (Вектор-Бест, Россия). Из 3,3 мг IgG было получено 43 мкг IgG1, из 10,8 мг IgG - 3 мкг IgG2, из 10 мг IgG - 58 мкг IgG3.

Связывание TNF с аффинным сорбентом Affi-Gel 15 (Bio-Rad, США) проводят согласно инструкции производителя. Для выделения аутоантител к TNF подклассов IgG1, IgG2 и IgG3 фракции выделенных подклассов IgG наносят на колонку с приготовленным сорбентом Affi-Gel 15-TNF. После снижения оптической плотности до нулевого значения удаляют неспецифически связавшиеся компоненты, затем промывают колонку рабочим буферным раствором и проводят элюцию связавшихся антител. После сбора целевой фракции колонку снова промывают рабочим буферным раствором. Используются следующие буферы: рабочий буфер - 20 mM PBS (pH 7.4), буфер для элюции - 0.1 M Gly-HCl/0.15 M NaCl (pH 2.5), буфер для удаления неспецифически связавшихся компонентов - 1M гуанидин-HCl (pH 7.4). При проведении элюции полученную фракцию нейтрализуют титрованием 1M Tris-HCl (pH 9.0) до физиологических значений pH. Выделенные фракции антител диализуют против 20 mM PBS (pH 7.4). Содержание подклассов IgG во фракции аутоантител к TNF оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием набора «Подклассы IgG - ИФА - БЕСТ». Содержание соответствующих подклассов во фракциях анти-TNF антител составило: IgG1 - 500 нг/мл, IgG2 - 100 нг/мл, IgG3 - 150 нг/мл.

Фракции аутоантител к иммунорегуляторному цитокину TNF подклассов IgG1, IgG2 и IgG3 выделены из фармацевтического препарата иммуноглобулина для внутривенного введения. Отсутствие примеси TNF во фракциях аутоантител подтверждено методом иммуноферментного анализа.

Использование колонок с сорбентами Bio-Gel P6 DG, Protein G Sepharose Fast Flow, Protein A Sepharose High Performance, анти-IgG2-Sepharose 4B, анти-IgG1-Sepharose 4B, анти-IgG4-Sepharose 4B, и Affi-Gel 15, связанного с TNF, и процедуры очистки с

использованием ультрафильтрации является эффективным способом получения фракций аутоантител к иммунорегуляторному цитокину TNF подклассов IgG1, IgG2 и IgG3 из фармацевтического препарата иммуноглобулина для внутривенного введения, что подтверждается тестами на чистоту фракций. Таким образом, в результате проведенных исследований разработан способ выделения аутоантител подклассов IgG1, IgG2 и IgG3 к иммунорегуляторному цитокину TNF, который может быть использован для выделения антител этих подклассов к другим цитокинам.

(57) Формула изобретения

Способ выделения подклассов иммуноглобулина G (IgG) аутоантител к иммунорегуляторному цитокину фактору некроза опухоли (TNF), заключающийся в получении общей фракции IgG аффинной хроматографией с использованием сорбента Protein G Sepharose с последующей нейтрализацией, объединением и диализом IgG, очистке полученной фракции IgG от примеси TNF, отличающийся тем, что выделение подклассов IgG производят из фармацевтического препарата иммуноглобулина для внутривенного введения, после получения фракции IgG осуществляют ее очистку от примеси TNF ультрафильтрацией с использованием центрифужных фильтров, затем проводят этап выделения антител IgG3 и получения смеси IgG1, IgG2, IgG4 аффинной хроматографией с использованием сорбента Protein A Sepharose, причем после выделения IgG3 проводят элюцию смеси IgG1, IgG2, IgG4 цитратным буфером с pH 3.0, с последующей нейтрализацией, объединением и диализом; затем выделяют антитела IgG1 многократной негативной аффинной хроматографией с использованием сорбента анти-IgG2 Sepharose с последующим объединением и диализом, затем выделяют антитела IgG2 многократной негативной аффинной хроматографией с использованием сорбента анти-IgG1 Sepharose с последующим объединением и диализом, затем проводят очистку антител IgG1 и IgG2 от примеси IgG4 негативной аффинной хроматографией с использованием сорбента анти-IgG4 Sepharose, после чего проводят выделение специфических аутоантител к TNF подклассов IgG1, IgG2, IgG3 аффинной хроматографией с использованием сорбента Affi Gel 15-TNF с последующей нейтрализацией, объединением и диализом.

35

40

45