

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038551**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.09.14**

**(21)** Номер заявки  
**201891434**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.12.16**

**(51)** Int. Cl. *A61K 38/19* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 17/00* (2006.01)  
*A61P 37/00* (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРОФИЛАКТИКИ СИСТЕМНОГО СКЛЕРОЗА**

---

**(31)** 62/268,637

**(32)** 2015.12.17

**(33)** US

**(43)** 2018.12.28

**(86)** PCT/US2016/067145

**(87)** WO 2017/106627 2017.06.22

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
ДЗЕ ДЖОНС ХОПКИНС  
ЮНИВЕРСИТИ (US)

**(72)** Изобретатель:  
Ли Сеулки, Помпер Мартин Г., Парк  
Дзонг-Сунг, Ох Юйминь, Скалли  
Магдалена, Хортон Морин (US)

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

**(56)** US-A1-20130101553  
US-A1-20150038511  
US-A1-20150259397  
US-A1-20140004120

**(57)** Настоящее изобретение относится к способам лечения и/или предотвращения системного склероза (СС, склеродермия). Способ включает введение субъекту агониста рецептора смерти, включающего в себя связанный с фактором некроза опухоли (ФНО) индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL), TRAIL<sub>PEG</sub> или антитело против DR5, в количестве, эффективном для блокирования или истощения активированных миофибробластов, осуществляя тем самым лечение СС у этого субъекта. Введение агониста рецептора смерти блокирует активацию фибробластов или профиброгенных клеток и/или уменьшает или истощает миофибробласты, тем самым уменьшая или предотвращая системный склероз.

**B1**

**038551**

**038551**

**B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Настоящая заявка в соответствии с разделом 35 119 (e) Свода законов США заявляет преимущество приоритета предварительной заявки на Патент США No.62/268637, поданной 17 декабря 2015 года, которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки.

### **Заявление об исследовании, финансируемом из федерального бюджета**

Настоящее изобретение было создано при государственной поддержке в форме гранта CA130460, выделенного Министерством обороны США (МО). Правительство обладает определенными правами на это изобретение.

### **Ссылка на список последовательностей**

Список последовательностей, представленный в виде текстового файла с именем "JHU C 13722 ST25.txt", созданный 14 декабря 2016 года и имеющий размер 2872 байта, включен в настоящее описание путем ссылки в соответствии с разделом 37 1.52 (e) (5) Свода федеральных нормативных актов США.

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение в целом относится к композициям и способам лечения аутоиммунного фиброзного заболевания при помощи агонистов рецепторов смерти.

### **Уровень техники изобретения**

Фиброз относится к патологическому состоянию, вызванному потерей нормальной функции из-за склероза тканей, при котором масса соединительной ткани, включая компоненты ткани, такие как коллаген, увеличивается, а нормальная ткань заменяется соединительной тканью. Фиброз может возникать в печени, легких, почках, сердце, коже и в других тканях.

Системный склероз (СС), также известный как склеродермия, представляет собой редкое аутоиммунное и ревматическое заболевание (McMahan ZH et al., Nat Rev Rheumatol; 9(2):90-100 (2013) and Varga J et al., J. Clin Invest; 117 (3): 557-567 (2007)). СС индуцирует огрубление соединительных тканей в форме фиброза (Ho YY et al., Nat Rev Rheumatol; 10 (7): 390-402 (2014) and Bhattacharyya S et al., Nat Rev Rheumatol; 8(1):42-54 (2012)), накопление белков внеклеточного матрикса (ВКМ), которое влияет на кожу наиболее видимых частей тела, таких как лицо и руки, а также в диффузной форме приводят к тяжелой дисфункции и отказу почти любого внутреннего органа, включая легкие, сердце, почки и желудок. Соответственно симптомы этого иммунного заболевания включают в себя фиброз кожи и внутренних органов, включая печень, легкие, почки, желудочно-кишечный тракт и сердце. Эти симптомы часто могут быть изнурительными для пациента. Распространенность СС широко варьируется в мире и составляет приблизительно 2,5 млн пациентов. Он вызывает самую высокую смертность среди всех ревматических состояний и не имеет стандарта лечения (Nikpour M et al., Curr Opin Rheumatol, 26 (2): 131-137 (2014)). До настоящего изобретения не существовало никаких методов лечения, которые уменьшают интенсивность и/или предотвращают фиброз кожи и фиброз внутренних органов, пораженных СС. Таким образом, существует значительная неудовлетворенная потребность в терапии СС, поскольку не появилось никаких лекарственных средств для его лечения.

### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на идентификации композиций и способов лечения или профилактики фиброзного аутоиммунного заболевания или расстройства, такого как системный склероз (СС). Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что способы и композиции настоящего изобретения действуют путем избирательного направленного воздействия на миофибробласты (например, активированные фибробласты), которые являются ключевыми клетками, вовлеченными в возникновение и/или прогрессирование фиброзных заболеваний, таких как СС и/или фиброзных состояний печени, легких, почек, сердца, желудочно-кишечного тракта, кожи, с такими фиброзными состояниями, которые могут быть связаны с такими заболеваниями как СС. Терапевтическая стратегия, изложенная здесь, основана на идентификации и применении агентов, которые являются агонистами рецепторов смерти (DR), их вариантов и/или производных, а также синтетических химических соединений и при необходимости других имитаторов встречающихся в природе агонистов DR.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения системного склероза (СС) у млекопитающего субъекта, включающему: введение субъекту агониста рецептора смерти, содержащего связанный с фактором некроза опухоли (ФНО) индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL), TRAIL<sub>PEG</sub> или антитело против DR5, в количестве, эффективном для блокирования или истощения активированных миофибробластов, осуществляя тем самым лечение СС у этого субъекта.

Предпочтительно активированные миофибробласты представляют собой TGF-β1-активированные миофибробласты.

В одном варианте осуществления изобретения СС представляет собой ограниченную склеродермию или диффузную склеродермию.

В соответствии с изобретением агонист рецептора смерти включает в себя рекомбинантный TRAIL человека или аналог TRAIL человека.

В соответствии с другим вариантом изобретения агонист рецептора смерти включает в себя нативный TRAIL или аналог нативного TRAIL.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агонист рецептора смерти включает в себя аго-

нист DR5, выбранный из группы, состоящей из лексатумумаба, тигатузумаба, конатумумаба, дрозитумаба, HGSTR2J/KMTRS, LBY-135 и одноцепочечного TRAIL-рецептор-связывающего домена (scTRAIL-RBD). В другом варианте осуществления изобретения, агонист рецептора смерти включает в себя поливалентный агонист DR, выбранный из группы, состоящей из TAS266 и TRAIL-RBDs.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к агонисту DR, прикрепленному к полимеру. В соответствующих вариантах осуществления изобретения этот полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ) или его производное. ПЭГ или его производное может представлять собой метоксиполиэтиленгликоль сукцинимидилпропионат, метоксиполиэтиленгликоль сукцинат N-гидроксисукцинимид, метоксиполиэтиленгликоль пропиональдегид, малеимид метоксиполиэтиленгликоля и многоветвленный полиэтиленгликоль.

ПЭГ или его производное имеет молекулярную массу от примерно 1000 до 100000 Да. В еще одном варианте осуществления изобретения ПЭГ или его производное имеет молекулярную массу от примерно 5000 до 50000.

Агонист DR может вводиться системно, локально или подкожно.

В одном варианте осуществления изобретения введение эффективного количества агониста рецептора смерти уменьшает толщину кожи, уровни содержания коллагена в коже, TGF- $\beta$ , PDGFR, PDGF, CTGF, IL-6 и/или уменьшает  $\alpha$ -SMA+ фибробластных клеток по сравнению с соответствующим контролем.

Предпочтительно фиброз у субъекта лечится или предотвращается по сравнению с соответствующим контролем.

В дополнительном варианте осуществления изобретения агонист рецептора смерти вводится субъекту путем инъекции в дозе от 0,001 до 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора смерти вводят в одной или нескольких дозах. При необходимости агонист рецептора смерти вводится субъекту в течение одного или нескольких дней.

В другом варианте осуществления изобретения субъект является человеком. В некоторых случаях субъект идентифицируется как имеющий или подверженный риску развития фиброзного аутоиммунного заболевания или расстройств.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения или предотвращения системного склероза (СС) у млекопитающего субъекта, включающему введение субъекту инъекционной фармацевтической композиции, содержащей TRAIL, TRAIL<sub>ПЭГ</sub> или антитело против DR5 в концентрации от 0,001% до 50% и фармацевтически приемлемый носитель.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 изображена схема дизайна исследования для мышинной модели *in vivo*, для изучения системного склероза, индуцированного блеомицином.

На фиг. 2 изображена столбчатая диаграмма, показывающая количественную оценку толщины кожи. Толщина кожи слоя дермы была увеличена более чем на 70% при индуцированном блеомицином фиброзе кожи по сравнению со здоровой кожей. TRAIL<sub>ПЭГ</sub> ослабило увеличение толщины кожи и вернуло ее к нормальному уровню. <sup>###</sup>p<0,001 по сравнению с нормой, \*p<0,05 по сравнению с наполнителем, \*\*\*p<0,001 по сравнению с наполнителем.

На фиг. 3 изображена столбчатая диаграмма, показывающая экспрессию мРНК CollA1 в поврежденной коже, которая была определена количественно при помощи ПЦР в реальном времени. Наблюдали 3-кратное увеличение уровней мРНК CollA1 и CollA2 у мышей, получавших блеомицин, по сравнению с нормальными мышами. Лечение TRAIL<sub>ПЭГ</sub> заметно ослабляет активацию коллагеновой мРНК. <sup>###</sup>p<0,001 по сравнению с нормой, \*\*\*p<0,001 по сравнению с наполнителем.

На фиг. 4 изображена столбчатая диаграмма, показывающая экспрессию мРНК трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1) в поврежденной коже, которая была определена при помощи ПЦР в реальном времени. Введение TRAIL<sub>ПЭГ</sub> существенно предотвращало повышение уровня экспрессии мРНК TGF- $\beta$ 1; <sup>#</sup>p<0,05 по сравнению с нормой, \*p<0,05 по сравнению с наполнителем.

На фиг. 5 изображена столбчатая диаграмма, показывающая экспрессию мРНК CollA1 при индуцированном легочном фиброзе, которая была определена количественно при помощи ПЦР в реальном времени. Результаты показали более 50% повышения уровня мРНК CollA1 у мышей, обработанных блеомицином, по сравнению с нормальными мышами; <sup>#</sup>p<0,05, <sup>###</sup>p<0,001 по сравнению с нормой; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 по сравнению с наполнителем.

На фиг. 6А изображена столбчатая диаграмма, показывающая экспрессию мРНК тромбоцитарного фактора роста (PDGF)- $\alpha$  в легких, индуцированных блеомицином, которая была определена количественно при помощи ПЦР в реальном времени. Результаты показали увеличение уровней мРНК PDGF $\alpha$  у мышей, обработанных блеомицином, по сравнению с нормальными мышами. Лечение TRAIL<sub>ПЭГ</sub> заметно ослабляло повышение уровня экспрессии мРНК PDGF- $\alpha$ ; <sup>#</sup>p<0,05, <sup>###</sup>p<0,001 по сравнению с нормой; \*p<0,05, \*\*\*p<0,001 по сравнению с наполнителем.

На фиг. 6В изображена столбчатая диаграмма, показывающая экспрессию мРНК PDGF- $\beta$  в легких, индуцированных блеомицином, которая была определена количественно при помощи ПЦР в реальном времени. Результаты показали увеличение уровней мРНК PDGF- $\beta$  у мышей, обработанных блеомици-

ном, по сравнению с нормальными мышами. Лечение TRAIL<sub>пЭГ</sub> заметно ослабляло повышение уровня экспрессии мРНК PDGF-β; #p<0,05, ###p<0,001 по сравнению с нормой; \*p<0,05, \*\*\*p<0,001 по сравнению с наполнителем.

### Подробное описание изобретения

#### I. Определения.

Используемый здесь термин "фиброзное аутоиммунное заболевание или расстройство" относится к любому аутоиммунному заболеванию или расстройству, которое характеризуется фиброзом. Системный склероз (СС, склеродермия) является приведенной в качестве примера формой фиброзного аутоиммунного заболевания или расстройства, как и любой аутоиммунно опосредованный фиброз печени, легких, почек, сердца, желудочно-кишечного тракта, кожи и т.д.

Термин "антитело" может относиться к поликлональной антисыворотке или моноклональному антителу. Антитела, описанные здесь, включают в себя не только интактное моноклональное антитело, но и иммунологически активный фрагмент антитела, например Fab или (Fab)<sub>2</sub> фрагмент; сконструированная одноцепочечная FV молекула; или химерную молекулу, например антитело, которое имеет специфичность связывания одного антитела, например мышинового происхождения, и оставшиеся части другого антитела, например человеческого происхождения. Антитела, описанные здесь, также включают в себя гуманизированное антитело, где антитело получено из видов антител не человеческого происхождения, белковая последовательность которых была модифицирована для увеличения их сходства с вариантами антител, продуцируемых естественным образом у людей. Как правило, гуманизированное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не является человеком. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки упоминаются здесь как "импортные" остатки, которые обычно берутся из "импортного" домена антител, в частности варибельного домена.

Используемый здесь "агонист" относится к молекуле, которая усиливает биологическую функцию белка. Таким образом, агонист может связываться с белком-мишенью, чтобы стимулировать его функции. Однако агонисты, которые не связывают белок, также предусмотрены. Агонист может усилить или активировать биологическую функцию белка прямо или косвенно. Агонисты, которые увеличивают экспрессию определенных генов, предусмотрены объемом конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения. Подходящие агонисты будут очевидны специалистам в данной области техники. Для настоящего изобретения необязательно, чтобы агонист напрямую активировал функцию белка-мишени. Скорее также предусматриваются агонисты, которые стабилизируют или усиливают функцию одного или нескольких белков, находящихся перед белком-мишенью в сигнальном пути, что в конечном итоге приводит к активации целевого белка. Альтернативно агонист может ингибировать функцию отрицательного регулятора транскрипции белка-мишени, где этот регулятор транскрипции действует перед белком-мишенью в сигнальном пути, что в конечном итоге подавляет транскрипцию целевого белка.

"Рецепторы смерти" образуют подкласс суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), который включает в себя восемь членов: Fas, TNFR1, рецептор нейротропина (p75NTR), рецептор эктодиспласина-A (EDAR), рецептор смерти (DR) 3, DR4, DR5 и DR6. Большинство рецепторов смерти идентифицируют соответствующие им природные лиганды: TNFR1 может активироваться ФНО, Fas активируется Fas-лигандом (FasL), p75NTR активируется фактором роста нервов (NGF, ген ID: 4803). Один лиганд для EDAR представляет собой эктодиспласин-A (EDA, ген ID: 1896). DR3 может быть активирован Aро3L (TWEAK/TNFSF12, ген ID: 8742), TL1A/VEG1 (ингибитор роста эндотелия сосудов/TNFSF15, ген ID: 9966), тогда как DR4 и DR5 используют один и тот же лиганд, связанный с ФНО индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL). Лиганд для DR6 не идентифицирован. Эти лиганды, их варианты или любая молекула, которые имитируют эффект природного лиганда, рассматриваются как агонист рецептора смерти. Каждый из этих природных лигандов и их агонистов считается агонистом рецептора смерти.

"Агонист рецептора смерти" здесь определяется как любая молекула, которая способна индуцировать проапоптотическую передачу сигнала через один или несколько рецепторов смерти. Агонист рецептора смерти может быть выбран из группы, состоящей из антител, лигандов смерти, цитокинов, векторов, экспрессирующих агонист рецептора смерти, пептидов, агонистов малых молекул, клеток (например, стволовых клеток), экспрессирующих агонист рецептора смерти, и лекарственных препаратов, вызывающих экспрессию лигандов смерти.

Типичные агонисты рецепторов смерти способны связываться с рецептором смерти и индуцировать апоптоз или запрограммированную гибель клеток через один или несколько внутриклеточных путей. Типичные хорошо изученные агонисты рецепторов смерти включают членов семейства лигандов ФНО, которые могут играть ключевую роль в регуляторном и отрицательном воздействии на иммунную толерантность, в дополнение к защитному и патогенному воздействиям на ткани (Rieux-Laucat et al., 2003, Current Opinion in Immunology 15:325; Mackay and Ambrose, 2003, Cytokine and growth factor reviews, 14: 311; Mackay and Railed, 2002, Current Opinion in Immunology, 14: 783-790). Примеры таких белков включают в себя связанный с фактором некроза опухоли индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL), лиганд Fas (FasL) и фактор некроза опухоли (ФНО). Типичные агонисты рецепторов смерти индуцируют апоптоз

при связывании с трансмембранными рецепторами, содержащими домен смерти. Например, TRAIL связывается с рецептором смерти 4 (DR4, TRAIL-рецептором 1) и 5 (DR5, TRAIL-рецептор 2). Существуют три других TRAIL-связывающих рецептора, но они считаются "рецепторами-ловушками", поскольку они, по-видимому, не способны передавать апоптотический сигнал. Рецептор-ловушка 1 (DcR1), по-видимому, не имеет трансмембранных и внутриклеточных доменов и прикреплен к плазматической мембране через гликозилфосфатидилинозитоловый "хвост". Рецептор-ловушка 2 (DcR2) обладает усеченным и, по-видимому, нефункциональным доменом смерти, в то время как третий рецептор-ловушка остеопротегерин представляет собой секретируемый растворимый рецептор. Fas-лиганд индуцирует апоптоз путем связывания с Fas (также известным как CD95 или Apo-1), тогда как DcR3 изолирует FasL от Fas. Другой агонист рецептора смерти, ФНО, может индуцировать апоптоз путем связывания с ФНО-рецептором I (также известным как TNFR1 или TNFR55).

Используемый здесь термин "вариант" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или полинуклеотида, но сохраняет существенные свойства. Типичный вариант полипептида отличается по аминокислотной последовательности от другого эталонного полипептида. Как правило, различия ограничены, так что последовательности эталонного полипептида и варианта близки к аналогичности и во многих областях идентичны. Вариант и эталонный полипептид могут отличаться по аминокислотной последовательности одной или несколькими модификациями (например, заменами, добавлениями и/или делециями). Замещенный или вставленный аминокислотный остаток может быть закодирован генетическим кодом или может не кодироваться им. Вариант полипептида может быть встречающимся в природе, такой как аллельный вариант, или он может представлять собой вариант, о котором известно, что он в природе не встречается.

"Член семейства факторов некроза опухоли" или "член семейства лигандов фактора некроза опухоли" представляет собой любой цитокин, который способен активировать рецептор фактора некроза опухоли. Используемый здесь термин "белок TRAIL" охватывает как белок TRAIL дикого типа, так и варианты TRAIL.

Модификации и изменения могут быть внесены в структуру полипептидов настоящего изобретения, получая при этом молекулу, имеющую сходные характеристики таких полипептидов (например, консервативная замена аминокислоты). Например, некоторые аминокислоты могут быть заменены на другие аминокислоты в последовательности без заметной потери активности. Поскольку способность к взаимодействию и природа полипептида определяет биологическую функциональную активность полипептида, некоторые замены в аминокислотной последовательности могут быть сделаны в полипептидной последовательности с получением, тем не менее, полипептида с аналогичными свойствами.

Например, под термином "вариант" агониста рецептора смерти подразумевается, что агонист рецептора смерти отличается по меньшей мере одним положением аминокислоты от последовательности дикого типа агониста рецептора смерти. Под термином "вариант" белка TRAIL подразумевается, что белок TRAIL отличается по меньшей мере одним аминокислотным положением от белка TRAIL дикого типа (также известного как TNFSF10, TL2, APO2L, CD253, Apo-2L), Entrez GeneID: 8743; регистрационный номер NM\_003810.2; UniProtKB/Swiss-Prot: P50591; UniProtKB/TrEMBL: Q61BA9.

Термин "агент" относится к любому низкомолекулярному химическому соединению, антителу, молекуле нуклеиновой кислоты или полипептиду или их фрагментам.

Используемый здесь термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" означает дозу, достаточную для лечения, ингибирования или облегчения одного или нескольких симптомов болезненного состояния, подвергаемого лечению, или иным образом обеспечивающую желаемый фармакологический и/или физиологический эффект. Точная доза будет варьироваться в зависимости от множества факторов, таких как зависящие от субъекта переменные (например, возраст, здоровье иммунной системы и т.д.), заболевание или расстройство и проводимое лечение. Действие эффективного количества может быть оценено относительно контроля. Такой контроль известен в данной области техники, обсуждается здесь и может быть, например, состоянием субъекта до или в отсутствие введения лекарственного средства или комбинации лекарственного средства, или в случае комбинаций лекарственных средств эффект комбинации можно сравнить с эффектом введения только одного из препаратов. В качестве контроля также может выступать субъект, нуждающийся в препарате/лечении, но не получавший препарат/лечение.

Термин "уменьшение интенсивности" означает уменьшение, подавление, ослабление, снижение, остановку или стабилизацию развития или прогрессирования заболевания.

В настоящем изобретении термины "содержит", "содержащий", "включающий в себя", "имеющий" и тому подобное могут иметь значение, приписываемое им в патентном праве США, и могут означать "включает", "включающий" и тому подобное; термины "состоящий в основном из" или "состоит в основном из" также имеют значение, приписываемое в патентном праве США, и эти термины являются открытыми, предполагают наличие характеристик сверх того, что было перечислено, до тех пор, пока основные или новые характеристики того, что перечислено, не изменяется из-за наличия характеристик сверх того, что было перечислено, но исключая варианты предшествующего уровня техники.

Термин "обнаружение" относится к идентификации присутствия, отсутствия или количества анали-

зируемого вещества, подлежащего обнаружению.

Термин "маркер" означает любой белок или полинуклеотид, имеющий изменение уровня экспрессии или активности, которое связано с заболеванием или расстройством.

Термин "уменьшать", "ингибировать", "облегчать" или "понижать" используется по сравнению с контролем. Специалист в данной области техники легко идентифицирует подходящий контроль для каждого эксперимента. Например, уменьшенный ответ у субъекта или клетки, обработанной химическим соединением, сравнивают с ответом у субъекта или клетки, которые не обрабатывались этим химическим соединением.

Термин "модулировать" означает изменять (увеличивать или уменьшать). Такие изменения обнаруживаются известными стандартными способами, такими как описанные здесь.

Необходимо понимать, что приведенные здесь диапазоны значений являются сокращением для всех значений в пределах диапазона. Например, предполагается, что диапазон от 1 до 50 включает в себя любое число, комбинацию чисел или поддиапазон, включая 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" или "клетка-хозяин" относится к клетке, которая содержит экзогенный полинуклеотид, независимо от способа, используемого для его введения, например прямого поглощения, трансдукции или других способов, известных в данной области техники, для создания рекомбинантных клеток-хозяев. Экзогенный полинуклеотид может поддерживаться как неинтегрированный вектор, например плазида, или, альтернативно, может быть интегрирован в геном хозяина. Используемый здесь термин "среда" или "среды" включает в себя любую культуральную среду, раствор, твердую, полутвердую или жесткую подложку, которая может поддерживать или содержать любую клетку-хозяина, включая бактериальные клетки-хозяева, дрожжевые клетки-хозяева, клетки-хозяева насекомых, клетки-хозяева растений, эукариотические клетки-хозяева, клетки-хозяева млекопитающих, клетки СНО, прокариотические клетки-хозяева, клетки-хозяева *E.coli* или клетки-хозяева *Pseudomonas* и содержимое клеток. Таким образом, этот термин может охватывать среду, в которой выращивается клетка-хозяин, например среду, в которой был секретирован TRAIL, включая среду до или после этапа пролиферации. Термин также может включать в себя буферы или реагенты, которые содержат лизаты клеток-хозяев, например в случае, когда TRAIL продуцируется внутриклеточно и клетки-хозяева лизируются или разрушаются, чтобы высвободить TRAIL.

Термин "уменьшать" означает отрицательное изменение по меньшей мере на 10, 25, 50, 75 или 100%.

Используемый здесь термин "получение", как в "получении агента", включает в себя синтез, покупку или иное приобретение агента.

Термин "субъект" означает млекопитающее, включая без ограничений человека или не являющееся человеком млекопитающее, такое как корова, лошадь, собака, овца или кошка.

Термин "TRAIL" также включает в себя гетеродимеры TRAIL, гомодимеры, гетеромультимеры или гомомультимеры любого одного или более TRAIL или любого другого полипептида, белка, углевода, полимера, малой молекулы, линкера, лиганда или другой биологически активной молекулы любого типа, химически связанной или экспрессированной в виде слитого белка, а также полипептидные аналоги, содержащие, например, специфичные делеции или другие модификации, но сохраняющие биологическую активность.

Используемые здесь термины "лечить", "лечение", "терапия" и тому подобное относятся к уменьшению или ослаблению интенсивности расстройства и/или симптомов (например, фиброза), связанных с ним. Понятно, что, хотя это не исключено, лечение расстройства или состояния не требует полного устранения расстройства, состояния или симптомов, связанных с ним.

Используемые здесь термины "предотвращать", "предотвращающий", "предотвращение", "профилактическое лечение" и тому подобное относятся к уменьшению вероятности развития расстройства или патологического состояния у субъекта, который не имеет, но подвергается риску или является восприимчивым к развитию расстройства или патологического состояния.

Термин "эталон" означает стандартное или контрольное условие.

Если специально не указано иное или это не очевидно из контекста, то используемый здесь термин "или" следует понимать как включительный. Если специально не указано иное или это не очевидно из контекста, термины, используемые здесь в единственном числе, включают в себя как единственное, так и множественное число.

Если специально не указано иное или это не очевидно из контекста, то используемый здесь термин "примерно" означает диапазон нормальной в данной области техники погрешности, например в пределах 2 стандартных отклонений от среднего значения. "Примерно" может означать в пределах 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1% от заявленного значения. Если иное не ясно из контекста, то все числовые значения, приведенные здесь, модифицированы термином "примерно".

Перечисление списка химических групп в любом переопределении переменной здесь включает в себя определения этой переменной как любой отдельной группы или комбинации перечисленных групп. Пе-

речисление варианта осуществления для переменной или аспекта здесь включает в себя этот вариант осуществления в качестве любого одного варианта осуществления или в сочетании с любыми другими вариантами осуществления или его частями.

Любые приведенные здесь композиции или способы могут быть объединены с одной или несколькими из любых других композиций и способов, представленных здесь.

Другие отличительные признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники из следующего подробного описания и формулы изобретения.

Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из нижеследующего описания предпочтительных вариантов его осуществления и из формулы изобретения. Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в той области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь, могут быть использованы в практике или испытаниях настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все опубликованные зарубежные патенты и заявки на патент, приведенные здесь, включены в настоящее изобретение путем ссылки. Регистрации в Genbank и NCBI, указанные регистрационным номером, приведенным здесь, включены в настоящее изобретение путем ссылки. Все другие опубликованные ссылки, документы, рукописи и научная литература, приведенные здесь, включены в настоящее изобретение путем ссылки. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь решающую силу. Кроме того, материалы, методы и примеры являются иллюстративными и не предназначены для ограничения.

## II. Композиции.

TRAIL (связанный с фактором некроза опухоли индуцирующий апоптоз лиганд, название гена TNFSF10) является лигандом смерти, который может индуцировать апоптоз в клетках, экспрессирующих родственные ему рецепторы смерти (DR), DR4 (название гена TNFRSF10A) и DR5 (название гена TNFRSF10B) (Johnstone RW et al., *Nat Rev Cancer*; 8(10): 782-798 (2008)). Благодаря своей уникальной способности выборочно индуцировать опосредованный DR апоптоз в DR+ клетках, не проявляя явной токсичности для нормальных клеток, рекомбинантные TRAIL и DR агонистические антитела активно изучались для целей терапии рака. Клинические исследования TRAIL показали широкую переносимость у людей, но не продемонстрировали надежного терапевтического эффекта в онкологии (Lemke J et al., *Cell Death Differ*; 21(9): 1350-1364 (2014)). Основными факторами, вызывающими неудовлетворительные результаты TRAIL при использовании в лечении больных раком пациентов, являются: 1) короткий период полувыведения (менее 30 мин у людей); 2) гетерогенные первичные раковые заболевания, как правило, устойчивы к TRAIL. Активированные первичные человеческие звездчатые клетки печени и поджелудочной железы, но не покоящиеся звездчатые клетки, становятся очень чувствительными к TRAIL-индуцированному апоптозу из-за активации DR4 и DR5 (публикация заявки на Патент США No. US 2016/0022776). Активированные ЗКП и ЗКПЖ считаются предшественниками фиброза печени и поджелудочной железы.

Патогенные механизмы, лежащие в основе фиброза при СС, являются сложными и в значительной степени неизвестными. Однако миофибробласты (МФБ), очевидно, являются одним из ключевых возбудителей этого заболевания (Ho YY et al., *Nat Rev Rheumatol*; 10(7): 390-402 (2014) и Bhattacharyya S et al., *Nat Rev Rheumatol*; 8(1): 42-54 (2012)). При хроническом повреждении или заболевании кожи постоянно присутствующие в ней фибробласты подвергаются активации и превращаются в пролиферативные, фиброгенные и сократительные  $\alpha$ -SMA+ МФБ, которые накапливаются на переднем крае активного фиброза. У МФБ повышена способность к синтезу коллагена и других компонентов ВКМ, а также нескольких фиброгенных компонентов для управления фиброгенезом кожи и его сохранения. По своей природе МФБ являются основной ранней мишенью для лечения фиброза кожи/СС. Поэтому разработка высоко-селективного агента, который может устранить предшественников СС, МФБ, но в то же время не повреждать нормальные клетки, может обеспечить выраженные антифибротические эффекты. Тем не менее, отсутствие надежных способов избирательного воздействия на МФБ в организме препятствует этой стратегии. Необходима новая стратегия по истощению  $\alpha$ -SMA+ МФБ при прогрессировании СС, которая оставляет неповрежденными нормальные клетки.

Существует потребность в терапии, которая уменьшает интенсивность и/или предотвращает фиброз кожи и фиброз внутренних органов, пораженных системным склерозом.

Таким образом, целью настоящего изобретения является создание композиций и способов для лечения или предотвращения системного склероза без побочной токсичности.

Другой целью настоящего изобретения является создание композиций и способов для уменьшения или блокирования активации фибробластов или профиброгенных клеток при системном склерозе, оставляя при этом нормальные клетки неповрежденными.

Другой целью настоящего изобретения является создание композиций и способов для уменьшения или истощения миофибробластов при системном склерозе, оставляя при этом нормальные клетки неповрежденными.

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на применении агонистов рецепторов

смерти (DR) (например, TRAIL и DR агонистических антител) в качестве терапевтического и/или профилактического способа или в качестве нативных агонистов, или их вариантов, или производных для лечения и/или предотвращения фиброзного аутоиммунного заболевания или расстройства (например, СС) у млекопитающего субъекта. Основная цель изложенных здесь исследований заключалась в идентификации агонистов рецепторов связанных с ФНО индуцирующих апоптоз лигандов (TRAIL) (TRA) (например, рекомбинантных TRAIL-вариантов и антител) в качестве противомембранных и/или противовоспалительных агентов, направленно воздействующих на местный и диффузный СС. Поэтому в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описывается уникальный механизм действия, который направленно воздействует и блокирует активацию основных фиброгенных клеток в миофибробласты (МФБ) или уничтожает ключевые фиброгенные клетки для прекращения фиброза и устранения воспаления при СС.

Описанные здесь исследования показывают, что агонисты рецепторов смерти могут индуцировать опосредованный TRAIL апоптоз активированных фибробластов и миофибробластов при СС. Важно отметить, что агонисты DR, включая TRAIL-аналог и DR-антитела, сильно уменьшают интенсивность фиброза и воспаления в комплементарных моделях СС путем избирательного блокирования активации фибробластов и истощения  $\alpha$ -SMA+ МФБ и одновременного снижения количества фиброзных компонентов без заметной токсичности.

Настоящее изобретение доказывает, что блокирование активации МФБ и истощение МФБ, основной популяции профиброгенных клеток, через активацию DR или индуцирует нормализацию состояния, или предотвращает прогрессирование выраженного фиброза при СС. TGF $\beta$ -активированные,  $\alpha$ -SMA+ первичные человеческие фибробласты спонтанно становятся восприимчивыми к TRAIL и DR агонистическому антителу через DR-опосредованный апоптоз. В отличие от некоторых типов первичных раковых клеток, активированные МФБ не были устойчивы к TRAIL. Исследования на двух комплементарных мышечных моделях СС подтвердили, что DR4 и DR5 являются сильно активированными на  $\alpha$ -SMA+ МФБ в фиброзных тканях кожи по сравнению с нормальными тканями кожи. Когда животные модели СС лечили как TRAIL аналогом, так и DR-антителом, было обнаружено, что агонисты DR направленно взаимодействуют с МФБ *in vivo* и явно уменьшают интенсивность выраженного фиброза без побочной токсичности. Кроме того, был проанализирован тканевой фиброз в биопсии кожи у здоровых субъектов и пациентов с СС. В нормальных тканях кожи не наблюдалось сильной экспрессии  $\alpha$ -SMA и DRs. В отличие от этого, в фиброзных тканях кожи пациентов с СС были обнаружены более высокие уровни DR4 и DR5, а также  $\alpha$ -SMA. Настоящее раскрытие дает новое понимание и клиническое обоснование для нового лечения СС.

В случае первичных тканей человека от пациентов с СС и животных моделей СС аналоги TRAIL рецепторов (TRA) останавливали фиброз и обширный воспалительный ответ, связанный с СС. На основе доклинических данных системно вводимый TRAIL ПЭГ, ПЭГилированный рекомбинантный человеческий гомотримерный TRAIL и анти-DR антитело направленно воздействовали на актин-положительные ( $\alpha$ -SMA+) миофибробласты гладкой мускулатуры *in vivo*, одновременно ингибируя множественные фиброгенные молекулы при СС. В мышечных моделях СС TRAIL ПЭГ и анти-DR антитела уменьшали склерозирование кожи и избыточный синтез коллагена до здорового уровня. Аналогичным образом TRAIL ПЭГ и анти-DR антитело уменьшали обширный фиброз при идиопатическом легочном фиброзе, возможном симптоме СС.

Во время повреждения ткани воспаление и аутоантитела активируют фибробласты в миофибробласты, которые вызывают фиброз. Рекрутированные клетки, такие как фиброциты, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга и перициты, также трансдифференцируются в миофибробласты во время развития фиброза. TRAIL ПЭГ и анти-DR антитело, по-видимому, направленно воздействовали и блокировали такую активацию и индуцировали опосредованную TRAIL клеточную гибель только в миофибробластах, но не в нормальных клетках, а также ослабляли воспалительный ответ, который активирует миофибробласты. В результате фиброгенный путь был остановлен и здоровые фибробласты повторно колонизировали орган. Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что агонисты DR, в том числе TRAIL ПЭГ и анти-DR антитела, направленно воздействовали на популяцию клеток миофибробластов и продемонстрировали свою способность

останавливать СС, воздействуя на все механизмы активации фибробластов, включая аутоиммунный механизм, механизмы воспаления и трансдифференцировки.

Дополнительные отличительные признаки раскрытого способа приведены ниже и далее в тексте описания.

А. Агонисты рецепторов смерти.

Агонисты рецепторов смерти, описанные здесь, включают TRAIL и агонистические антитела рецепторов смерти, а также их аналоги, варианты, фрагменты и производные.

1. TRAIL.

Связанный с фактором некроза опухоли (ФНО) индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL) является членом семейства ФНО и представляет собой трансмембранный белок, который принимает участие в

апоптозе. TRAIL представляет собой белок, состоящий из 281 аминокислоты, в котором внеклеточный домен, включающий в себя аминокислоты от аргинина в положении 115 до глицина в положении 281 или треонина в положении 95 до глицина в положении 281, влияет на апоптоз.

Последовательность TRAIL белка человека доступна как REFSEQ регистрационный номер NP 003801 и приведена ниже (SEQ ID NO: 1):

```
MAMMEVQGGPSLGTCLVLIIVFTVLLQSLCVAVTYVYFTNELKQMQDKYSKSGIACFLK
EDDSYWDPNDEESMNSPCWQVKWQLRQLVRKMILRTSEETISTVQEKQONISPLVREGRPQVA
AHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQ
TYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELK
ENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVG
```

Три молекулы TRAIL-мономера образуют структурно модифицированный тример. TRAIL-тример собирается с рецепторами, участвующими в гибели клеток, для индукции апоптоза. Основное различие между TRAIL и другими членами суперсемейства ФНО заключается в его способности не индуцировать гибель клеток в нормальных тканях. Поскольку ФНО влияет на нормальные клетки, а также вызывает гибель раковых клеток и чрезмерно активированных иммунных клеток, он имеет ограниченную применимость. В отличие от этого, TRAIL вызывает апоптоз в широком диапазоне раковых клеток и чрезмерно активированных иммунных клеток, но мало влияет на нормальные клетки. Это связано с дифференциальной экспрессией TRAIL рецепторов в разных типах клеток.

TRAIL индуцирует апоптоз посредством взаимодействия с его рецепторами. В настоящее время у человека идентифицированы 4 рецептора для TRAIL, включая рецептор смерти 4 (DR4), рецептор смерти 5 (DR5), рецептор-ловушку 1 (DcR1), рецептор-ловушку 2 (DcR2) и остеопротегрин (OPG). TRAIL индуцирует смерть через каспаз-зависимый апоптоз при связывании с DR4 и DR5, которые содержат консервативный мотив домена смерти (DD). DcR1 и DcR2 действуют как ловушки из-за их способности ингибировать индуцированный TRAIL апоптоз при избыточной экспрессии. DcR1 и DcR2 имеют близкую гомологию с внеклеточными доменами DR4 и DR5. DcR2 имеет усеченный нефункциональный цитоплазматический DD, в то время как DcR1 не имеет цитозольной области и прикрепляется к плазматической мембране через гликофосфолипидный фрагмент. Цитоплазматический домен DcR2 является функциональным и активирует NF-κB, что приводит к транскрипции генов, о которых известно, что они противодействуют сигнальному пути смерти и/или способствуют воспалению. Связывание лиганда с DR4 вызывает тримеризацию рецепторов и кластеризацию его внутриклеточных доменов смерти, что приводит к образованию индуцирующего смерть комплекса (DISC). DISC рекрутирует адаптерные молекулы и инициирует связывание и активацию каспаз для индукции апоптоза. Индуцирование или восстановление проведения сигнала через TRAIL-рецепторы представляет собой противораковую стратегию. Было также показано, что TRAIL ингибирует аутоантиген-специфичные Т-лимфоциты, указывая на то, что он может подавлять аутоиммунные реакции.

В дополнение к токсичности по отношению к некоторым нормальным клеткам, TRAIL имеет короткий период полувыведения *in vivo* и имеет разные периоды полувыведения в зависимости от вида животных, используемых в тестах. Например, сообщается, что TRAIL имеет период полураспада в течение нескольких минут у грызунов и около 30 мин у человекообразных обезьян (H. Xiang, et al. Drug Metabolism and Disposition 2004, 32, 1230-1238). В частности, большая часть TRAIL быстро выводится из организма через почки.

#### а) Аналоги TRAIL.

TRAIL может взаимодействовать со своими рецепторами как тример. Поэтому в некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд или агонист, используемый в описанных здесь способах, представляет собой или может образовывать мультимер, предпочтительно тример. Тример может быть гомотримером или гетеротримером.

Все описанные здесь белки TRAIL могут быть получены с использованием стандартных методов выделения природных или рекомбинантных белков и химически модифицированы, как описано здесь.

Конъюгат TRAIL может включать в себя аналог TRAIL, или фрагмент связывания агонистического рецептора TRAIL, или его вариант. Аналоги TRAIL известны в данной области техники. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения аналоги имеют повышенную аффинность или специфичность к одному или нескольким агонистическим рецепторам TRAIL (например, TRAILR1 (DR4) и/или TRAIL-R2 (DR5)), пониженную аффинность или специфичность к одному или нескольким антагонистическим рецепторам TRAIL или рецепторам-ловушкам TRAIL (например, рецепторам DcR1 и DcR2) или их комбинацию, по сравнению с диким типом или эндогенным TRAIL.

В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог представляет собой DR4-селективный мутант TRAIL дикого типа. DR-4 селективные мутанты известны в данной области техники и описаны, например, в Tur, J. Biological Chemistry, 283(29): 20560-8 (2008). В конкретном варианте осуществления изобретения аналог представляет собой вариант SEQ ID NO: 1, имеющий замещенную D218H или

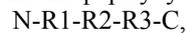
D218Y, или его функциональный фрагмент (например, внеклеточный домен).

В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог представляет собой DRS-селективный мутант TRAIL дикого типа. Конкретные DR-5-селективные мутанты включают в себя варианты SEQ ID NO: 1, имеющие замены D269H, D269H/E195R или D269H/T214R, и их функциональные фрагменты (например, внеклеточный домен). Такие варианты описаны в van der Sloot, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103(23): 8634-9 (2006).

b) Слитые белки TRAIL.

Конъюгат TRAIL может представлять собой слитый белок TRAIL. Слитые полипептиды TRAIL имеют первого партнера по слиянию, включая весь или часть внеклеточного домена TRAIL, слитого (i) непосредственно со вторым полипептидом, или (ii) необязательно слитый с линкерной пептидной последовательностью, которая слита со вторым полипептидом. Слитые белки при необходимости содержат домен, который функционирует для димеризации или мультимеризации двух или более слитых белков. Пептидный/полипептидный линкерный домен может быть или отдельным доменом или альтернативно может содержаться в одном из других доменов (TRAIL полипептид или второй полипептид) слитого белка. Аналогично домен, функцией которого является димеризация или мультимеризация слитых белков, может представлять собой или отдельный домен или альтернативно может содержаться в одном из других доменов (TRAIL полипептид, второй полипептид или пептид/полипептидный линкерный домен) слитого белка. В одном варианте осуществления изобретения домен димеризации/мультимеризации и пептидный/полипептидный линкерный домен являются одинаковыми.

Слитые белки, описанные здесь, могут иметь формулу I:



где "N" представляет собой N-конец слитого белка, "C" представляет собой C-конец слитого белка, "R1" является полипептидом TRAIL, "R2" является необязательным пептидным/полипептидным линкерным доменом, а "R3" является вторым полипептидом. Альтернативно R3 может быть полипептидом TRAIL, а R1 может быть вторым полипептидом.

Слитые белки могут быть димеризованы или мультимеризованы. Димеризация или мультимеризация могут происходить между двумя или более слитыми белками через домены димеризации или мультимеризации. Альтернативно димеризация или мультимеризация слитых белков могут происходить путем химического сшивания. Димеры или мультимеры, которые образуются, могут быть гомодимерными/гомомультимерными или гетеродимерными/гетеромультимерными.

Присутствие второго полипептида может изменять растворимость, стабильность, аффинность и/или валентность слитого полипептида TRAIL. Используемый здесь термин "валентность" относится к числу сайтов связывания, доступных на молекулу. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй полипептид содержит один или несколько доменов константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, предпочтительно имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую шарнирной, CH2 и CH3 областям цепи C $\gamma$ 1 иммуноглобулина человека, или шарнирной CH2 и CH3 областям цепи C $\gamma$ 2a мышинового иммуноглобулина. В конкретном димерном слитом белке димер является результатом ковалентного связывания остатка Cys в шарнирной области двух тяжелых цепей Ig, которые являются теми же остатками Cys, которые образуют дисульфидную связь в димеризованных нормальных тяжелых цепях Ig.

В конкретном варианте осуществления изобретения слитый белок TRAIL представляет собой имитатор TRAIL, включающий в себя три последовательности промотора TRAIL, объединенные в одну полипептидную цепь, называемую одноцепочечным TRAIL-рецептор-связывающим доменом (scTRAIL-RBD), как описано в Gieffers, Molecular Cancer Therapeutics, 12(12): 2735-47 (2013). Два из так называемых scTRAIL-RBD с тремя рецептор-связывающими сайтами каждый могут быть приведены в непосредственную близость, в результате чего образуется мультимерный слитый белок с шестивалентным режимом связывания. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультимеризация достигается путем слияния C-конца Fc-части человеческого иммуноглобулина G1-мутеина с полипептидом scTRAIL-RBD, тем самым создавая шесть сайтов связывания рецептора на молекулу лекарственного средства.

Принудительная димеризация scFv-scTRAIL на основе модификации линкера scFv для целевого scTRAIL, состоящего преимущественно из димеров (Db-scTRAIL), превышает активность нецелевого scTRAIL примерно в 100 раз для некоторых типов клеток-мишеней. Повышенная активность Db-scTRAIL была также продемонстрирована на не несущих мишеней клетках, что указывает на то, что в дополнение к таргетированию олигомеризация, эквивалентная, по меньшей мере, димерной сборке стандартного TRAIL в чистом виде, усиливает проведение апоптозного сигнала. Поэтому в предпочтительных вариантах осуществления изобретения слитые белки TRAIL имеют домен мультимеризации, такой как домен димеризации или тримеризации, или их комбинацию, которая может приводить, например, к димерной, тримерной или гексамерной молекуле.

Другой слитый белок, который облегчает образование тримеров, включает в себя рецептор-связывающий фрагмент TRAIL, аминотерминально слитый с тримеризирующим доменом лейциновой или изолейциновой молнии.

Слитые белки TRAIL и результаты использования слитых белков в функциональных анализах также описаны в Wahl, *Hepatology*, 57 (2): 625-36 (2013).

## 2. TRAIL<sub>ПЭГ</sub>: ПЭГилированный TRAIL.

### а) Полиэтиленгликоль.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) представляет собой полимер, имеющий структуру  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}$  в линейной форме. Из-за своей высокой гидрофильности ПЭГ позволяет увеличить растворимость белков лекарственного средства при присоединении к ним. Кроме того, при соответствующем соединении с белком ПЭГ увеличивает молекулярную массу модифицированного белка при сохранении основных биологических функций, таких как активность фермента и связывание с рецептором; тем самым уменьшая выведение с мочой, защищая белок от клеток и антител, распознающих экзогенные антигены, и уменьшает деградацию белка протеазами. Молекулярная масса ПЭГ, способного связываться с белками, колеблется от примерно 1000 до 100000. Известно, что ПЭГ, имеющий молекулярную массу выше 1000, обладает очень низкой токсичностью. ПЭГ, имеющий молекулярную массу от 1000 до 6000, легко распределяется по всему организму и метаболизируется через почки. В частности, ПЭГ, имеющий молекулярную массу 40000, распределяется в крови и органах, включая печень, и метаболизируется в печени. Примеры ПЭГ или производных ПЭГ включают в себя без ограничений метоксиполиэтиленгликольсукцинимидилпропионат, метоксиполиэтиленгликольсукцинат N-гидроксисукцинимид, метоксиполиэтиленгликольпропиональдегид, метоксиполиэтиленгликольмалеимид и многоветвленный полиэтиленгликоль.

В этой связи ПЭГ избирательно присоединяли к N-концу TRAIL, как описано в публикации Международной заявки WO 2007/145457, включенной в настоящее изобретение путем ссылки. Кроме того, ПЭГилирование заметно повышало растворимость и стабильность TRAIL (например, стабильность, период полувыведения и активность *in vivo* ПЭГилированного TRAIL были значительно больше, чем у TRAIL нативного типа). Было также обнаружено, что ПЭГилирование улучшает фармакокинетические профили связанного лекарственного средства с долговременным хранением в различных композициях, тем самым снижая частоту введения лекарственного средства и обеспечивая длительную продолжительность действия препарата.

### і) Полиалкиленоксиды и TRAIL.

Использование гидрофильных полимеров, таких как полиалкиленоксиды или их сополимеров, таких как PLURONIC®, продаваемых BASF, может быть в форме ковалентной связи с молекулами для улучшения фармакокинетических и фармакодинамических профилей TRAIL (Kim, et al., *Bioconjugate Chem.*, 22 (8), pp 1631-1637 (2011)). Исследования показывают, что аналоги TRAIL, дериватизированные ПЭГ, поддерживают противоопухолевую активность, а также демонстрируют более высокую метаболическую стабильность в плазме, расширенные фармакокинетические профили и более длительные периоды полувыведения (Chae, et al., *Molecular cancer therapeutics* 9(6): 1719-29 (2010); Kim, et al., *Bioconjugate chemistry*, 22(8): 1631-7 (2011); Kim, et al., *Journal of pharmaceutical sciences* 100(2): 482-91 (2011); Kim, et al., *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 150 (1): 639 (2011)).

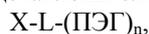
Поэтому в некоторых вариантах осуществления изобретения домен TRAIL дериватизируется с помощью одной или нескольких единиц этиленгликоля (ЭГ), более предпочтительно 2 или более единиц ЭГ (то есть полиэтиленгликоля (ПЭГ)) или его производного. Производные ПЭГ включают в себя без ограничений метоксиполиэтиленгликольсукцинимидилпропионат, метоксиполиэтиленгликоль N-гидроксисукцинимид, метоксиполиэтиленгликольальдегид, метоксиполиэтиленгликольмалеимид и многоветвленный полиэтиленгликоль.

Точное количество единиц ЭГ или производных зависит от желаемой активности, стабильности в плазме и фармакокинетического профиля. Например, в работе Kim, et al. (см. выше) сообщалось, что 2, 5, 10, 20 и 30К-ПЭГ-TRAIL приводили к большему периоду полужизни в кровотоке, равному 3,9, 5,3, 6,2, 12,3 и 17,7 ч у мышей, против 1,1 ч для TRAIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулярная масса ПЭГ составляет от примерно 1 до 100 кДа, предпочтительно от примерно 1 до 50 кДа. Например, ПЭГ может иметь молекулярную массу "N" кДа, где N представляет собой любое целое число от 1 до 100. ПЭГ может иметь молекулярную массу "N" Да, где N представляет собой любое целое число от 1000 до 1000000. В конкретном варианте осуществления изобретения молекулярная масса ПЭГ составляет "N" Да, где "N" составляет от 1000 до 50000 или более предпочтительно от 5000 до 50000.

Проапоптотический агент может быть конъюгирован с линейным или разветвленным ПЭГ. Некоторые исследования показали, что белки, дериватизированные разветвленным ПЭГ, имеют увеличенный период полужизни *in vivo* в кровотоке по сравнению с линейными ПЭГ-белками, что, как полагают, частично связано с большим гидродинамическим объемом разветвленных ПЭГ-белков Fee, et al., *Biotechnol Bioeng.*, 98(4): 725-3 (2007).

Пептидные лиганды могут быть дериватизированы на C-конце или предпочтительно на N-конце при помощи способов, которые известны в данной области техники.

Конъюгаты TRAIL-ПЭГ могут быть представлены следующей формулой:



где

X представляет собой белок TRAIL,

L представляет собой линкер,

ПЭГ представляет собой разветвленную цепь поли(этиленгликоля) и

n представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

В конкретных вариантах осуществления изобретения n равно 2.

Полиалкиленоксид связывается с белком через линкер. Линкер может представлять собой полиалкиленоксид и предпочтительно связывает два полиалкиленоксидных полимера с белком.

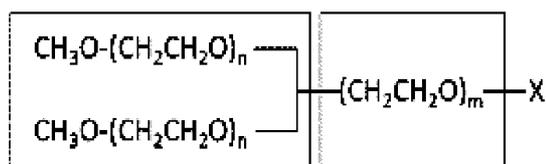
В конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат TRAIL представляет собой ПЭГ-конъюгат, который включает в себя домен TRAIL, содержащий усеченную форму TRAIL человека, например от аргинина-114 до глицина-281 полноразмерной формы (1-281) TRAIL человека, и ПЭГ, имеющий молекулярную массу от 1000 до 100000 дальтон и предпочтительно от 5000 до 50000 дальтон.

Модифицированные на N-конце конъюгаты ПЭГ-TRAIL могут быть получены путем взаимодействия N-концевого амина домена TRAIL с альдегидной группой ПЭГ в присутствии восстановителя. ПЭГ и TRAIL можно подвергнуть взаимодействию при молярном отношении (ПЭГ/TRAIL) от 2 до 10 или предпочтительно от 5 до 7,5.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения конъюгат TRAIL включает мотив аминокислотной молнии, например мотив изолейциновой молнии, который позволяет образовать тример между тремя мономерами конъюгата TRAIL.

Цепочки ПЭГ предпочтительно, но не обязательно, имеют равную молекулярную массу. Типичные диапазоны молекулярной массы для каждой цепи ПЭГ составляют от примерно 10 до 60 кДа и предпочтительно примерно 20 и 40 кДа. ПЭГ40 представляет собой разветвленную часть ПЭГ, которая синтезируется и имеет молекулярную массу 40 кДа: 20+20 кДа (каждая цепь ПЭГ).

Тримерное соединение ПЭГ может состоять из разветвленной цепи ПЭГ, прикрепленной к линкеру. Визуальное описание тримерного соединения ПЭГ приведено ниже.



**Разветвленный ПЭГ**  
Общая Мол. масса 10-60 кДа  
Предпочтительно 20-40 кДа

**ПЭГ линкер**  
Общая Мол. масса 1-30 кДа  
Предпочтительно 2-20 кДа

Были синтезированы следующие тримерные ПЭГ: YPEG42, YPEG43.5, YPEG45, YPEG50 и YPEG60.

YPEG42 представляет собой тримерное соединение ПЭГ, которое имеет молекулярную массу 42 кДа: (20+20 кДа) (разветвленный ПЭГ)+2 кДа (линкер).

YPEG43.5 представляет собой тримерное соединение ПЭГ, которое имеет молекулярную массу 43,5 кДа: (20+20 кДа) (разветвленный ПЭГ)+3,5 кДа (линкер).

YPEG45 представляет собой тримерный фрагмент ПЭГ, который имеет молекулярную массу 45 кДа: (20+20 кДа) (разветвленный ПЭГ)+5 кДа (линкера).

YPEG50 представляет собой тримерное соединение ПЭГ, которое имеет молекулярную массу 50 кДа: (20+20 кДа) (разветвленный ПЭГ)+10 кДа (линкер).

YPEG60 представляет собой тримерное соединение ПЭГ, которое имеет молекулярную массу 60 кДа: (20+20 кДа) (разветвленный ПЭГ)+20 кДа (линкер).

ii) Линкерная молекула.

Белок или пептид ковалентно соединяют с разветвленной молекулой ПЭГ через линкер. Линкер представляет собой полимер и обычно имеет атомную длину по меньшей мере 800 ангстрем. Обычно линкер имеет атомную длину от примерно 800 до примерно 2000 ангстрем, от примерно 800 до примерно 1500 ангстрем, от примерно 800 до примерно 1000 ангстрем или от примерно 900 до примерно 1000 ангстрем. Следует принимать во внимание, что приведенные выше атомные расстояния относятся к полностью распрямленным полимерам и что, когда линкер находится в твердом состоянии или растворе, он может складываться или скручиваться таким образом, что фактическое расстояние между разветвленным ПЭГ и белком или пептидом меньше, чем атомные длины, перечисленные выше.

В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представляет собой производное поли(этиленгликоля) с молекулярной массой от примерно 1 до 30 кДа, предпочтительно от примерно 2 до 20 кДа. Линкер также может быть природной или неприродной аминокислотой длиной по меньшей мере 80 единиц.

Альтернативы ПЭГ для линкера включают синтетические или природные водорастворимые биосовместимые полимеры, такие как полиэтиленоксид, поливиниловый спирт, полиакриламид, белки, такие как гиалуроновая кислота и хондроитинсульфат, целлюлозы, такие как гидроксиметилцеллюлоза, поли-

виниловый спирт и полигидроксиалкил (мет)акрилаты.

Белки и пептиды могут быть ковалентно связаны с линкером с использованием обычных химических реактивов. Первичные аминогруппы, такие как обнаруженные на N-конце или в остатках лизина, будут взаимодействовать с альдегидами и их эквивалентами в восстановительных условиях с получением аминов. (Molineux, *Current pharmaceutical design*, 10(11): 1235-1244 (2004)). Меркапто (-SH) группы, такие как обнаруженные в остатках цистеина, могут подвергаться конъюгатному присоединению с различными акцепторами Михаэля, включая производные акриловой и метакриловой кислот, а также малеимиды (Gong et al., *British Journal of Pharmacology*, 163(2): 399-412 (2011)). Другие подходящие нуклеофильные группы, обнаруженные в пептидах и белках, включают в себя дисульфидные связи (Broschini, et al., *Nature protocols*, 1: 2241-2252 (2006)) и гистидиновые остатки (Cong, et al., *Bioconjugate Chemistry*, 23(2): 248-263 (2012)).

Линкер может ковалентно соединяться с белком или пептидом с использованием обычных химических реактивов. Например, линкерный полимер может быть дериватизирован на одном конце электрофильной группой, такой как альдегид, эпоксид, галоген (хлор, бром, йод), сульфатный эфир (тозилат, мезилат), акцептор Михаэля или активированные карбоксилаты, а затем вступать в реакцию с нуклеофильной амино или тиольной группой в белке или пептиде. Подходящие акцепторы Михаэля включают в себя производные ацильной и метакриловой кислот, такие как акриламиды, метакриламиды, акрилаты и метакрилаты, а также малеимиды. Подходящие активированные карбоксилаты включают в себя сложные эфиры нитрофенилкарбоната и NHS (N-гидроксисукцинат). В других вариантах осуществления изобретения пептиды и белки, содержащие остатки аргинина, могут быть ковалентно соединены с линкером, содержащим реакционноспособную функциональную группу 1,3 дикетона.

Конъюгаты могут быть получены путем первого соединения линкера с пептидом или белком с последующим соединением линкера с разветвленным поли(этиленгликолем) или путем первого соединения линкера с разветвленным поли(этиленгликолем) с последующим соединением линкера с пептидом или белком. Оптимальная последовательность образования связей определяется конкретными химическими превращениями.

с) Макромолекулы.

В других вариантах осуществления изобретения TRAIL может быть дериватизирован как TRAIL длительного действия с расширенным периодом полужизни с использованием биополимеров или полипептидов посредством описанных способов; например, но без ограничений, с использованием химически конъюгированной гиалуроновой кислоты (Yang et al., *Biomaterials* 32(33): 8722-8729 (2011)), деполукообразующие полипептиды (Amiram et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(8): 2792-2792 (2013)), публикация заявки на патент США No. US 2013-0178416 A1) и TRAIL, связанная с развернутыми рекомбинантными полипептидами (публикация заявки на патент США No. US 2010-0239554 A1).

d) Комплексы.

Домен TRAIL может быть объединен с отрицательно заряженной молекулой. В некоторых вариантах осуществления изобретения отрицательно заряженная молекула может облегчать загрузку лиганда или агониста в наночастицу для продолжительной, равномерной или времязависимой доставки. В некоторых вариантах осуществления изобретения отрицательно заряженная молекула сама опосредует продолжительную, равномерную или времязависимую доставку лиганда или агониста. Предпочтительно отрицательно заряженная молекула существенно не уменьшает способность лиганда или агониста индуцировать или усиливать апоптоз.

Было разработано и показано, что образование комплекса между положительно заряженным TRAIL и отрицательно заряженным хондроитинсульфатом (XC) (XC/TRAIL) облегчает загрузку TRAIL в микросферы (МС) поли(лактид-ко-гликолида) (ПЛГ) без снижения активности TRAIL (Kim, et al., *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(1): 11-21 (2013)). Наноконкомплекс размером приблизительно 200 нм был получен в массовом соотношении 2 TRAIL к XC (TC2) при значении pH 5,0. Этот комплекс имел на >95% более высокую эффективность загрузки в ПЛГ МС, полученные методом мультимембранной эмульсии, по сравнению с нативным TRAIL. Поэтому в некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд или агонист, в частности TRAIL-пептиды, и их варианты, функциональные фрагменты и слитые белки или их конъюгаты, такие как ПЭГ-конъюгаты, объединены с хондроитинсульфатом и необязательно загружаются в микро- или наночастицы, например частицы на основе ПЛГ.

В других вариантах осуществления изобретения лиганд или агонист, в частности TRAIL-пептиды, и их варианты, функциональные фрагменты и их слитые белки или их конъюгаты, такие как ПЭГ-конъюгаты, объединены с гиалуроновой кислотой (ГК). Показано, что наноконкомплекс ПЭГ-TRAIL и ГК, полученные путем смешивания положительно заряженного ПЭГ-TRAIL и отрицательно заряженной ГК, обладают стабильной длительной доставкой *in vivo* с незначительной потерей биоактивности по сравнению с ПЭГ-TRAIL (Kim, et al., *Biomaterials*, 31(34): 9057-64 (2010)). Доставка была дополнительно усилена путем введения наночастиц в 1%-ном растворе ГК.

В. Композиции антител и способы получения.

Очищенные полипептиды рецептора TRAIL, его фрагменты, слитые белки или антигены или их эпитопы могут быть использованы для получения антитела, которое специфически связывается с рецеп-

тором TRAIL. Антитела могут быть получены при помощи любых подходящих способов, известных в данной области техники. Затем антитела могут быть скринированы на функциональную активность (например, агонистическую или антагонистическую активность) с использованием способов, известных в данной области техники. Примеры агонистических антител включают в себя антитела к рецепторам смерти DR4 и DR5.

#### 1. Агонистические антитела к рецепторам смерти.

Некоторые аспекты настоящего изобретения включают в себя агонистические антитела (включая, или, альтернативно, фрагменты антител или их варианты), направленные на рецепторы смерти (например, TRAIL антитела). Антитела могут быть получены и очищены с использованием способов, известных специалистам в данной области техники. Например, антитело может быть аффинно очищено из сыворотки животного (например, мыши, крысы, кролика, козы, осла, лошади, утки или курицы). Для лечения фиброзного аутоиммунного заболевания (например, системного склероза) также может применяться множество доступных антител к DR, антитела к DR4 и DR5. Примерами агонистов DR являются лексатумумаб, тигатузумаб, конатумумаб, дрозитумаб, мапатумумаб, HGSTR2J/KMTRS и LBY-135. В некоторых вариантах осуществления изобретения DR-антитело представляет собой поливалентный агент, например TAS266.

Антитело настоящего изобретения может представлять собой полипептид, который включает в себя элементы канонической последовательности иммуноглобулинов, достаточные для специфичного связывания с конкретным мишенью-антигеном. Как известно в данной области техники, интактные антитела, продуцируемые в природе, представляют собой тетрамерные агенты массой приблизительно 150 кД, состоящие из двух идентичных полипептидов тяжелой цепи (около 50 кД каждая) и двух идентичных полипептидов легкой цепи (около 25 кД каждая), которые связываются друг с другом в структуру, которую обычно называют "Y-образной" структурой. Каждая тяжелая цепь включает в себя по меньшей мере четыре домена (каждый длиной около 110 аминокислот) - аминоконцевой вариабельный домен (VH) (расположенный на конце Y структуры), за которым следуют три константных домена: CH1, CH2 и карбоксиконцевой домен CH3 (расположенный в основании стебля Y структуры). Короткая область, известная как "переключатель", соединяет вариабельную и константную области тяжелой цепи. "Шарнир" связывает домены CH2 и CH3 с остальной частью антитела. Две дисульфидные связи в этой шарнирной области соединяют два полипептида тяжелой цепи друг с другом в интактном антителе. Каждая легкая цепь включает в себя два домена - аминоконцевой вариабельный домен (VL), за которым следует константный карбоксиконцевой домен (CL), отделенные друг от друга другим "переключателем". Тетрамеры интактных антител состоят из двух димеров тяжелой цепи и легкой цепи, в которых тяжелая и легкая цепи связаны друг с другом одной дисульфидной связью; две другие дисульфидные связи соединяют шарнирные области тяжелой цепи друг с другом так, что димеры соединены друг с другом и образуют тетрамер. Естественно продуцируемые антитела также гликозилированы, как правило, в домене CH2. Каждый домен в естественном антителе имеет структуру, характеризующуюся "укладкой иммуноглобулина", образованной из двух бета-слоев (например, 3-, 4- или 5-кратно сложенных слоев), упакованных друг против друга в сжатой антипараллельной бета-бочке. Каждый вариабельный домен содержит три гипервариабельные петли, известные как "определяющие комплементарность области" (CDR1, CDR2 и CDR3), и четыре несколько инвариантные "каркасные" области (FR1, FR2, FR3 и FR4). Когда естественные антитела складываются, FR области образуют бета-слои, которые обеспечивают структурный каркас для доменов, а области CDR петли как из тяжелой, так и легкой цепей объединяются в трехмерную структуру, так что они создают единый гипервариабельный антигенсвязывающий сайт, расположенный на конце Y-структуры. Область Fc существующих в природе антител связывается с элементами системы комплемента, а также с рецепторами на эффекторных клетках, включая, например, эффекторные клетки, которые опосредуют цитотоксичность. Как известно в данной области техники, аффинность и/или другие связывающие признаки Fc областей для Fc-рецепторов могут быть изменены посредством гликозилирования или другой модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело является поликлональным; в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело является моноклональным. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет последовательности константной области, которые характерны для антител мыши, кролика, приматов или человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения элементы последовательности антител являются полностью человеческими или являются гуманизированными, приматизированными, химерными и т.д., как известно в данной области техники. Кроме того, используемый здесь термин "антитело" может относиться в соответствующих вариантах осуществления изобретения (если иное не указано или явно не следует из контекста) к любой из известных или созданных конструкций или форматов для использования структурных и функциональных признаков антитела в альтернативном представлении.

Антитела могут быть получены в культуре клеток, в фаге или у разных животных. В одном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой антитело млекопитающего. Методы получения в фаге могут быть использованы для выделения исходного антитела или для получения вариантов с измененной специфичностью или авидностью. Такие методы являются обычными и хорошо известны в

данной области техники. В одном варианте осуществления изобретения антитело получают при помощи рекомбинантных технологий, известных в данной области техники. Например, рекомбинантное антитело может быть получено путем трансфекции клетки-хозяина вектором, содержащим последовательность ДНК, кодирующую антитело. Один или несколько векторов могут быть использованы для трансфекции последовательности ДНК, экспрессирующей по меньшей мере одну VL и одну VH область в клетке-хозяине. Примеры описания рекомбинантных технологий генерации и продуцирования антител включают в себя Delves, *Antibody Production: Essential Techniques* (Wiley, 1997); Shephard, et al., *Monoclonal Antibodies* (Oxford University Press, 2000); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles And Practice* (Academic Press, 1993); *Current Protocols In Immunology* (John Wiley & Sons, последнее издание).

Раскрытые антитела могут быть модифицированы при помощи рекомбинантных технологий для увеличения эффективности антитела в осуществлении желаемой функции. Антитела могут быть модифицированы замещениями с использованием рекомбинантных технологий. Как правило, эти замены будут консервативными заменами. Например, по меньшей мере одна аминокислота в константной области антитела может быть заменена другим остатком. См., например, патент США No. 5624821, патент США No. 6195551, международную заявку WO 9958572; и Angal, et al., *Mol. Immunol.* 30: 105-08 (1993). Модификация аминокислот включает в себя делеции, добавления и замены аминокислот. В некоторых случаях такие изменения приводят к уменьшению нежелательной активности, например комплементзависимой цитотоксичности. Часто антитела метят путем ковалентного или нековалентного соединения с веществом, которое обеспечивает детектируемый сигнал. Известно большое разнообразие меток и методов конъюгации, которые широко представлены как в научной, так и в патентной литературе. Эти антитела можно скринировать на связывание с рецепторами TRAIL. См., например, *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Oxford University Press, 1996).

Подходящие антитела с желаемой биологической активностью могут быть идентифицированы с помощью анализа *in vitro*, включая без ограничений анализ пролиферации, миграции, адгезии, роста на мягком агаре, ангиогенеза, межклеточной коммуникации, апоптоза, транспорта, трансдукции сигнала, а также последующего анализа *in vivo*, такого как ингибирование роста опухоли.

Антитела, которые могут быть использованы в раскрытых композициях и способах, включают в себя целый иммуноглобулин (то есть интактное антитело) любого класса, его фрагменты и синтетические белки, содержащие, по меньшей мере, антигенсвязывающий варибельный домен антитела. Варибельные домены у антител различаются по последовательности и используются в связывании и специфичности каждого конкретного антитела для его конкретного антигена. Однако изменчивость обычно не распределяется равномерно по варибельным доменам антител. Она обычно концентрируется в трех сегментах, называемых определяющими комплементарность областями (CDR) или гиперварибельными областями как в легкой цепи, так и в варибельных доменах тяжелой цепи. Более высококонсервативные части варибельных доменов называются каркасными областями (FR). Варибельные домены нативных тяжелых и легких цепей содержат четыре области FR, в основном принимающие конфигурацию бета-слоя, соединенную тремя CDR, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях составляющие часть структуры бета-слоя. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости от FR областей и вместе с CDR из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител.

Также раскрыты фрагменты антител, которые обладают биологической активностью. Фрагменты, присоединенные или не присоединенные к другим последовательностям, включают в себя вставки, делеции, замены или другие выбранные модификации конкретных областей или отдельных аминокислотных остатков при условии, что активность фрагмента существенно не изменяется или не нарушается по сравнению с немодифицированным антителом или фрагмент антитела.

Методы также могут быть адаптированы для получения одноцепочечных антител, специфичных к антигенному белку настоящего изобретения. Способы получения одноцепочечных антител хорошо известны специалистам в данной области техники. Одноцепочечное антитело может быть создано путем слияния варибельных доменов тяжелой и легкой цепей с использованием короткого пептидного линкера, тем самым воссоздавая сайт связывания антигена на одной молекуле. Одноцепочечные варибельные фрагменты антитела (scFvs), в которых С-конец одного варибельного домена связан с N-концом другого варибельного домена через 15-25-аминокислотный пептид или линкер, были сконструированы без значительного нарушения антигенсвязывания или специфичность связывания. Линкер выбирают так, чтобы тяжелая цепь и легкая цепь связывались вместе в их надлежащей конформационной ориентации.

Двухвалентные одноцепочечные варибельные фрагменты (di-scFvs) могут быть получены путем связывания двух scFv. Это можно быть сделано путем получения одной пептидной цепи с двумя VH и двумя VL областями, получая тандемные scFv. ScFvs также может быть сконструирован с помощью линкерных пептидов, которые являются слишком короткими, чтобы две варибельные области складывались вместе (около пяти аминокислот), заставляя scFvs димеризоваться. Этот тип известен как диатела. Было показано, что диатела имеют константы диссоциации в 40 раз ниже соответствующих scFv, что означает, что они имеют гораздо более высокую аффинность к своей мишени. Еще более короткие линкеры (одна или две аминокислоты) приводят к образованию тримеров (триатела или тритела). Также были полу-

чены тетратела. Они демонстрируют еще более высокую аффинность к своим мишеням, чем диатела.

Моноклональное антитело получают из в значительной степени однородной популяции антител, то есть индивидуальные антитела в популяции идентичны, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в небольшом подмножестве молекул антитела. Моноклональные антитела включают в себя "химерные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также к фрагментам таких антител, если они проявляют желаемую антагонистическую активность.

Моноклональные антитела могут быть получены с использованием любой процедуры, которая дает моноклональные антитела. В гибридном способе мышь или другое подходящее животное-хозяин обычно иммунизируют иммунизирующим агентом для образования лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с иммунизирующим агентом. Альтернативно лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*.

Антитела также могут быть получены с помощью технологий рекомбинантных ДНК. ДНК, кодирующая антитела настоящего изобретения, может быть легко выделена и секвенирована с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Библиотеки антител или фрагментов активного антитела также могут быть получены и скринированы с использованием технологии фагового дисплея.

## 2. Человеческие и гуманизированные антитела.

Многие нечеловеческие антитела (например, полученные от мышей, крыс или кроликов) естественным образом являются антигенными у людей и, таким образом, могут приводить к нежелательным иммунным реакциям при введении людям. Следовательно, использование человеческих или гуманизированных антител в способах настоящего изобретения уменьшает вероятность того, что антитело, вводимое человеку, вызовет нежелательный иммунный ответ.

Трансгенные животные (например, мыши), которые способны при иммунизации продуцировать полный репертуар человеческих антител в отсутствие продуцирования эндогенного иммуноглобулина, могут быть использованы. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена области присоединения тяжелой цепи антитела (J(H)) у мутантных мышей, полученных из химерных клеток и клеток зародышевого типа, приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенных антител. Перенос матрицы гена иммуноглобулина клеток зародышевого типа человека у таких мутантных мышей, полученных из клеток зародышевого типа, приведет к получению человеческих антител после введения им антигена. При необходимости антитела получают в других видах и "гуманизируют" для введения людям. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулина или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела включают в себя иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) антитела-реципиента заменяют остатками CDR нечеловеческого (донорского) антитела, например мышинного, крысиного или кроличьего, желаемой специфичности, аффинности и способности. В некоторых случаях Fv-каркасные остатки человеческого иммуноглобулина заменяются соответствующими остатками нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в импортированных CDR или каркасных последовательностях. В целом, гуманизированное антитело будет содержать практически все, по меньшей мере один и, как правило, два переменных домена, в которых все или практически все области CDR соответствуют тем или иным нечеловеческим иммуноглобулинам и все или практически все области FR представляют собой области консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело оптимально также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека.

Способы гуманизации нечеловеческих антител хорошо известны в данной области техники. Как правило, гуманизированное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не является человеком. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто упоминаются как "импортные" остатки, которые обычно берутся из "импортного" переменного домена. Методы гуманизации антитела обычно включают использование технологии рекомбинантных ДНК для манипулирования последовательностью ДНК, кодирующей одну или несколько полипептидных цепей молекулы антитела. Гуманизацию можно осуществить главным образом путем замещения CDR грызунов или CDR-последовательностей соответствующими последовательностями человеческого антитела. Соответственно гуманизированная форма нечеловеческого антитела (или его фрагмента) представляет собой химерное антитело или фрагмент, где существенно меньше, чем интактный переменный домен человека, был заменен соответствующей последовательностью из нечеловеческих видов. На практике гуманизи-

рованные антитела обычно представляют собой человеческие антитела, в которых некоторые CDR-остатки и, возможно, некоторые остатки FR замещены остатками из аналогичных сайтов антител грызунов.

Выбор переменных доменов человека, как легкой, так и тяжелой цепей, для использования в создании гуманизированных антител очень важен для уменьшения антигенности. В соответствии с методом "наилучшего соответствия" последовательность переменного домена антитела грызуна скринируется против всей библиотеки известных последовательностей переменных доменов человека. Последовательность человека, которая наиболее близка к последовательности грызунов, затем принимается в качестве человеческого каркаса (FR) для гуманизованного антитела. Другой метод использует конкретную структуру, полученную из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Та же каркасная область может использоваться для создания нескольких различных гуманизированных антител.

Кроме того, важно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели гуманизированные антитела предпочтительно получают способом анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина являются наиболее распространенными и известны специалистам в данной области техники. Имеются компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных последовательностей кандидатов-иммуноглобулинов. Проверка этих дисплеев позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании последовательности кандидата-иммуноглобулина, то есть проводить анализ остатков, которые влияют на способность кандидата-иммуноглобулина связывать свой антиген. Таким образом, остатки FR могут быть выбраны и объединены из консенсусной и импортной последовательности, так что достигается желаемая характеристика антитела, такая как повышенная аффинность к целевому антигену. Как правило, остатки CDR непосредственно и наиболее существенно влияют на связывание антигена.

### 3. Одноцепочечные антитела.

Способы получения одноцепочечных антител хорошо известны специалистам в данной области техники. Одноцепочечное антитело создается путем слияния переменных доменов тяжелой и легкой цепей с использованием короткого пептидного линкера, тем самым воссоздавая сайт связывания антигена на одной молекуле. Одноцепочечные переменные фрагменты антитела (scFvs), в которых С-конец одного переменного домена связан с N-концом другого переменного домена через 15-25-аминокислотный пептид или линкер, были сконструированы без значительного нарушения антигенсвязывания или специфичность связывания. Линкер выбирают так, чтобы тяжелая цепь и легкая цепь связывались вместе в их надлежащей конформационной ориентации. Эти Fvs не имеют константных областей (Fc), присутствующих в тяжелых и легких цепях нативного антитела.

### 4. Моновалентные антитела.

Способы *in vitro* также подходят для получения моновалентных антител. Расщепление антител для получения их фрагментов, в частности Fab-фрагментов, может быть выполнено с использованием обычных методов, известных в данной области техники. Например, расщепление может быть выполнено с использованием папаина. Расщепление антител папаином обычно приводит к образованию двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых Fab-фрагментами, каждый с одним сайтом связывания антигена, и остаточный фрагмент Fc. Обработка пепсином приводит к образованию фрагмента, называемого фрагментом F(ab')<sub>2</sub>, который имеет два антигенсвязывающих сайта и по-прежнему способен к перекрестному связыванию антигена.

Fab-фрагменты, образующиеся при расщеплении антител, также содержат константные домены легкой цепи и первый константный домен тяжелой цепи. Fab' фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена тяжелой цепи, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Фрагмент F(ab')<sub>2</sub> представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab', соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области. Fab'-SH является здесь обозначением для Fab', в котором остатки цистеина константных доменов имеют свободную тиольную группу. Фрагменты антител первоначально были получены в виде пар Fab'-фрагментов, которые имеют шарнирные цистеины между собой. Известны также другие химические соединения фрагментов антител.

### 5. Гибридные антитела.

Антитела могут представлять собой гибридное антитело. В гибридных антителах одна пара тяжелой и легкой цепей гомологична той, которая обнаружена в антителе, полученном против одного эпитопа, тогда как другая пара тяжелой и легкой цепей гомологична паре, обнаруженной в антителе, полученном против другого эпитопа. Это приводит к свойству мультифункциональной валентности, то есть двухвалентное антитело обладает способностью связывать по меньшей мере два разных эпитопа одновременно. Такие гибриды могут быть образованы путем слияния гибридом, продуцирующих соответствующие компонентные антитела, или при помощи рекомбинантных технологий. Такие гибриды, разумеется, могут также быть получены с использованием химерных цепей.

#### 6. Способ получения антител с использованием белковой химии.

Один из способов получения белков, содержащих антитела, заключается в связывании двух или более пептидов или полипептидов вместе методами белковой химии. Например, пептиды или полипептиды могут быть химически синтезированы с использованием имеющегося в настоящее время лабораторного оборудования с использованием или Fmoc (9-фторенилметилоксикарбонил), или Boc (трет-бутилоксикарбонил) химии. (Applied Biosystems, Inc., Фостер-Сити, Калифорния). Специалист в данной области может легко понять, что пептид или полипептид, соответствующий антителу, например, может быть синтезирован при помощи стандартных химических реакций. Например, пептид или полипептид может быть синтезирован и не отделен из его синтетической смолы, тогда как другой фрагмент антитела может быть синтезирован и впоследствии отщеплен от смолы, тем самым образуя терминальную группу, которая функционально заблокирована на другом фрагменте. При помощи реакций конденсации пептидов эти два фрагмента могут быть ковалентно соединены посредством пептидной связи на своих карбоксильных и аминоконцах соответственно с образованием антитела или его фрагмента. Альтернативно пептид или полипептид независимо синтезируют *in vivo*, как описано выше. После выделения эти независимые пептиды или полипептиды могут быть связаны с образованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента посредством аналогичных реакций конденсации пептидов.

Например, ферментативное лигирование клонированных или синтетических пептидных сегментов позволяет связывать относительно короткие пептидные фрагменты с образованием более крупных пептидных фрагментов, полипептидов или целых белковых доменов. Альтернативно природное химическое лигирование синтетических пептидов может быть использовано для синтеза крупных пептидов или полипептидов из более коротких пептидных фрагментов. Этот способ состоит из двухступенчатой химической реакции. Первой стадией является хемоселективная реакция незащищенного синтетического пептида-альфа-тиозфира с другим незащищенным сегментом пептида, содержащим аминоконцевой остаток Cys, с получением промежуточного соединения с тиозфиром в качестве исходного ковалентного продукта. Без изменения условий реакции это промежуточное соединение подвергается спонтанной, быстрой внутримолекулярной реакции с образованием нативной пептидной связи в сайте лигирования.

#### III. Способы применения.

Агонисты рецепторов смерти, описанные здесь, могут применяться отдельно или в качестве активных агентов в фармацевтических композициях или препаратах для лечения субъектов с аутоиммунным фиброзом, таким как системный склероз.

##### A. Склеродермия (системный склероз, СС).

Склеродермия представляет собой аутоиммунное, ревматическое и хроническое заболевание, которое поражает организм затвердеванием соединительной ткани. Соединительная ткань состоит из многих видов белков (например, коллагена) и широко распространена. СС вызывает фиброз кожи и внутренних органов, который является смертельным компонентом СС. Фиброз представляет собой патологический процесс, характеризующийся чрезмерным накоплением компонентов соединительной ткани в органе или ткани. Фиброз развивается в результате дерегулированного заживления ран (например, избыточного синтеза коллагена) в ответ на хроническое повреждение тканей или хроническое воспаление. Избыток коллагена препятствует нормальному функционированию органов (JHU Scleroderma Center: [www.hopkinscleroderma.org](http://www.hopkinscleroderma.org)). Прогрессирующий фиброз, который меняет структуру ткани и приводит к постепенной потере функции органа, признается одной из основных причин заболеваемости и смертности у людей с СС (одним из самых смертельных ревматических заболеваний). Активированные миофибробласты альфа-актина гладких мышц ( $\alpha$ -SMA) являются клетками, которые продуцируют шрам внеклеточного матрикса при фиброзе (Ho et al., *Nat Rev Rheumatol* 10, 390-402 (2014)).  $\alpha$ -SMA+ клетки часто используются в качестве биомаркера образования миофибробластов и являются основным источником склеродермии.

СС - это редкое заболевание, и в настоящее время диагностировано менее 500000 человек в Соединенных Штатах. Примерно 80% пациентов составляют женщины, а средний возраст диагноза составляет 40 лет (от 35 до 50 лет). Смертность чаще всего проявляется при поражении легких, сердца и почек, хотя выживаемость значительно улучшилась благодаря эффективному лечению от почечной недостаточности. Фиброз легких является наиболее распространенной причиной смерти с 50%-ной смертностью в течение 10 лет после постановки диагноза.

Ранние симптомы СС включают в себя изменения в пальцах, при которых они становятся очень чувствительными к холоду, могут изменять цвет при холодовом или эмоциональном стрессе (например, феномен Рейно) и могут стать тугоподвижными и опухшими. Изменения цвета пальцев вызваны спазмом и сужением кровеносных сосудов. Это происходит из-за избытка коллагена, который сужает кровеносные сосуды, и реакция кровеносных сосудов кожи на низкие температуры и эмоциональный стресс чрезмерная. Чувствительность к холоду и изменения цвета называются феноменом Рейно. Феномен Рейно является широко распространенным заболеванием. У большинства людей с феноменом Рейно не развивается склеродермия. Существует два типа феномена Рейно: первичный (субъект, у которого диагностирован феномен Рейно и нет склеродермии) и вторичный (субъект, у которого диагностирован феномен

Рейно и склеродермия).

Фиброз может также влиять на внутренние органы и может привести к нарушению или повреждению пораженных органов. Наиболее часто пораженными органами являются пищевод, сердце, легкие и почки. Поражение внутренних органов может проявляться изжогой, затруднением глотания (дисфагия), высоким артериальным давлением (гипертонией), проблемами с почками, одышкой, диареей или ухудшением мышечных сокращений, которые перемещают пищу через пищеварительный тракт.

Приблизительно от 15 до 25% людей с признаками системной склеродермии также имеют признаки и симптомы другого патологического состояния, которое поражает соединительную ткань, например полимиозит, дерматомиозит, ревматоидный артрит, синдром Шегрена или системная красная волчанка. Сочетание системной склеродермии с другими аномалиями соединительной ткани известно как перекрывающийся синдром склеродермы.

1. Типы склеродермии.

а) Ограниченная склеродермия (синдром CREST).

Ограниченная склеродермия характеризуется как более мягкая форма СС. Ограниченная склеродермия в основном поражает кожу шеи лица и дистально локтей и коленей, а поздняя стадия заболевания вызывает изолированную легочную гипертензию. Как правило, ограниченная склеродермия вызывает меньшее поражение органов тела, чем более тяжелая форма. У некоторых пациентов может развиваться болезнь легких и сердца.

Ограниченная склеродермия связана с синдромом CREST (кальциноз, феномен Рейно, дисфункция пищевода, склеродактилия, телеангиэктазия). Накопление кальция в коже и тканях может быть болезненным и может раздражать или разрывать поверхность кожи.

Как описано выше, синдром Рейно связан с непереносимостью холода. Кислотный рефлюкс в результате дискинезии пищевода может быть болезненным, вызывая раздражение слизистой оболочки пищевода. Телеангиэктазия представляет собой состояние, характеризующееся расширением капилляров, что вызывает их появление в виде красных или пурпурных кластеров. Они обычно не вызывают симптомов и могут быть удалены с помощью лазерной терапии.

б) Диффузная склеродермия.

Диффузная склеродермия часто затрагивает больше областей, включая кожу, сердце, легкие, желудочно-кишечный тракт и почки (например, области становятся утолщены в результате избыточного синтеза коллагена). Стянутая кожа затрудняет сгибание пальцев, рук и других суставов, и часто наблюдается воспаление суставов, сухожилий и мышц.

в) Системный склероз без склеродермии.

При системном склерозе без склеродермии фиброз поражает один или несколько внутренних органов, но не кожу. Пораженные внутренние органы включают в себя пищевод, легкие, сердце и почки.

В. Субъекты, подлежащие лечению.

Субъекты, подлежащие лечению описанными способами, включают в себя пациентов, страдающих системным склерозом. Эти пациенты могут страдать от ограниченной склеродермии или диффузной склеродермии. Пациент может страдать от ранних симптомов СС и может иметь первичный или вторичный феномен Рейно. Пациенты могут страдать от кальциноза, феномена Рейно, дисфункции пищевода, склеродактилии, телеангиэктазии и/или диффузной склеродермии. Пациент может иметь раннюю, среднюю или позднюю стадию заболевания.

Субъекты, подлежащие лечению, могут страдать от одной или нескольких форм системного склероза при отсутствии других фиброзных заболеваний, таких как фиброз или воспаление внутренних органов. Примеры включают в себя группы пациентов, которые страдают системным склерозом в присутствии или отсутствии фиброза печени, субъектов, страдающих системным склерозом, в присутствии или отсутствии цирроза печени, субъектов, страдающих системной склеродермией, в присутствии или отсутствии фиброза поджелудочной железы, и субъектов, страдающих системным склерозом, в присутствии или отсутствии панкреатита.

Другие примеры пациентов, подлежащих лечению, включают в себя пациентов, страдающих системным склерозом, в присутствии или отсутствии диабета 2 типа, артрита или других аутоиммунных заболеваний, таких как диабет 1 типа, ревматоидный артрит, системная красная волчанка или рассеянный склероз.

Другие примеры пациентов, подлежащих лечению, включают в себя пациентов, страдающих системным склерозом, в присутствии или отсутствии пролиферативного заболевания, такого как рак.

С. Существующие терапии и лечение СС.

В настоящее время не существует никакого лечения для СС; однако лечение доступно для некоторых симптомов. Примерами такого лечения являются препараты для смягчения кожи и уменьшения воспаления, кроме того, было показано, что при воздействии тепла на пациента имеет место благотворный эффект. Хотя нет эффективных и безопасных долгосрочных методов лечения или одобренных Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США препаратов, доступных местными формами лечения, которые не влияют на прогрессирование заболевания, но могут облегчать его симптомы (например, боль и изъязвление). Могут применяться иммунодепрессанты, хотя глюкокорти-

коиды имеют ограниченное применение. Также применяются различные нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) (например, напроксен), а также стероиды (например, преднизон). Другие агенты, которые могут применяться для облегчения симптомов, включают в себя блокаторы кальциевых каналов (например, нифедипин), простаглицлин, агонист рецептора эндотелина (например, босентан), метотрексат, циклоспорин, пеницилламин, ингибиторы АПФ, циклофосфамид, эпопростенол, босентан и аэролизированный илопрост.

Исследования в фармацевтической промышленности часто направлены на идиопатический фиброз легких (IPF) в сочетании со склеродермией. Ассортимент разрабатываемых препаратов в нескольких фармацевтических компаниях, включая Hoffmann-La Roche, Ltd, Bayer AG, Celgene Corporation, InterMune, Inc. и Corbus Pharmaceuticals Holdings, Inc., связан с аутоиммунными заболеваниями (например, ревматоидным артритом и ювенильным идиопатическим артритом). Однако ни одна из текущих терапевтических стратегий не направлена на то, чтобы инвертировать течение фиброза и устранить воспаление при СС.

#### D. Комбинированная терапия.

Комбинированная терапия включает в себя введение субъекту эффективного количества агониста рецептора смерти вместе с одним или несколькими дополнительными агентами. Дополнительные агенты могут включать в себя терапевтические средства, применяемые в настоящее время для уменьшения интенсивности симптомов системного склероза.

Дополнительные агенты включают в себя иммунодепрессанты, такие как метотрексат, азатиоприн, меркаптопурин, дактиномицин, антрациклины, митомицин С, блеомицин, митрамицин, глюкокортикоиды, базиликсимаб, даклизумаб, муромонаб-CD3, циклоспорин, такролимус, сиролимус, эверолимус, интерфероны и микофенолят, противомикробные агенты, такие как неомидин, стрептомицин, хлорамфеникол, цефалоспорин, ампициллин, пенициллин, тетрациклин и ципрофлоксацин, стероиды и стероидные лекарственные средства, такие как клиндамицинфосфат, метронидазол, гидрохлорид метронидазола, сульфат гентамицина, гидрохлорид линкомицина, тобрамицин сульфат, гидрохлорид ванкомицина, сульфат полимиксина В, колистиметат натрия и колистинсульфат, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, такие как индометацин, кетопрофен, флурбипрофен, напроксен, ибупрофен, рамифеназон и пироксикам, анальгетики, такие как аспирин, ацетаминофен, ибупрофен, натрий напроксен, бупренорфин, пропоксифен гидрохлорид, пропоксифен напсилат, меперидин гидрохлорид, гидроморфон гидрохлорид, морфин, оксикодон, кодеин, дигидрокодеин битартрат, пентазоцин, гидрокодон битартрат, леворфанол, дифлунизал, троламин салицилат, налбуфин гидрохлорид, мефенамовая кислота, буторфанол, холин салицилат, буталбитал, фенилтолоксаминцитрат, дифенгидраминцитрат, метотремидразин, циннамедрин гидрохлорид и мепробамат, витамины, блокаторы кальциевых каналов, такие как амлодипинен, дилтиазем, фелодипин, исрадипин, никардипин, нифедипин, нисолдипин и верапамил, агонисты рецептора эндотелина, метотрексат, циклоспорин, пеницилламин, ингибиторы АПФ, такие как беназеприл каптоприл, эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, мозексиприл, периндоприл, хинаприл, рамиприл и трандолаприл, циклофосфамид, эпопростенол, босентан и аэролизированный илопрост.

Дополнительные агенты могут вводиться одновременно с агонистами рецепторов смерти.

Альтернативно дополнительные агенты могут вводиться до или после введения эффективного количества агониста рецептора смерти. Предшествующее или последующее введение дополнительного агента (агентов) может быть разделено во времени с введением эффективного количества агониста рецептора смерти, по меньшей мере на 3 ч, по меньшей мере на 6 ч, по меньшей мере на 12 ч, по меньшей мере на 24 ч, по меньшей мере на 48 ч, по меньшей мере на 72 ч, по меньшей мере на 4 суток, по меньшей мере на 5 суток, по меньшей мере на 6 суток, по меньшей мере на 7 суток, по меньшей мере на 2 недели, по меньшей мере на 3 недели или по меньшей мере на месяц.

#### E. Фармацевтические композиции и режимы дозирования.

##### 1. Фармацевтические композиции.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям химических соединений.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения, как правило, включают в себя агент, такой как агонист рецептора смерти, и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, оболочки, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Тип носителя может быть выбран на основе предполагаемого пути введения. В различных вариантах осуществления изобретения носитель подходит для внутривенного, внутривнутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, местного, трансдермального или перорального введения. Фармацевтически приемлемые носители включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением того, что любая обычная среда или агент несовместима с активным агентом, их использование предполагается в фармацевтических композициях настоящего изобретения. Дополнительные вспомогательные агенты также

могут быть включены в эти композиции.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть получена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в состав композиции изотонические агенты, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто путем включения в состав агента, который задерживает всасывание, например моностеаратные соли и желатин. Кроме того, агенты можно вводить в препарате с замедленным высвобождением, например в композиции, которая включает в себя полимер с замедленным высвобождением. Активные агенты могут быть получены с носителями, которые будут защищать агент от быстрого высвобождения, например, препарат с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки.

Могут быть использованы биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры, полимолочная кислота и полимолочные, полигликолевые сополимеры (ПЛГ). Специалистам в данной области техники известно множество способов получения таких препаратов.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного вещества в требуемом количестве в подходящий растворитель, при необходимости содержащий один или несколько ингредиентов, перечисленных выше, с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения агента в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием, с помощью которых получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его ранее стерильно-фильтрованного раствора.

В зависимости от способа введения агент может быть покрыт материалом, чтобы защитить его от действия ферментов, кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать агент. Например, агент может вводиться субъекту в подходящем носителе или разбавителе, совместно с ингибиторами ферментов или в подходящем носителе, таком как липосомы. Фармацевтически приемлемые разбавители включают в себя солевые и водные буферные растворы. Ингибиторы ферментов включают в себя ингибитор панкреатического трипсина, диизопропилфторфосфат (ДФФ) и трасилол. Липосомы включают в себя эмульсии типа "вода-в-масле-в воде", а также обычные липосомы (Strejan, et al., (1984) *J. Neuroimmunol* 7:27). Дисперсии также могут быть получены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и в масле. В обычных условиях хранения и применения эти препараты могут содержать консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

## 2. Эффективные количества и единичные дозированные формы.

Активный агент в композиции (например, TRAIL<sub>пэг</sub>, DR антитело) предпочтительно содержится в композиции в терапевтически эффективном количестве. Терапевтически эффективное количество активного агента может варьироваться в зависимости от таких факторов как стадия заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность агента вызывать желаемый ответ у индивидуума. Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения благоприятного терапевтического ответа. Термин "терапевтически эффективное количество" также относится к такому количеству, при котором любые токсичные или вредные эффекты агента перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами. В другом варианте осуществления изобретения активный агент содержится в композиции в профилактически эффективном количестве. Термин "профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, поскольку профилактическая доза используется у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества.

Количество активного соединения в композиции может варьироваться в зависимости от таких факторов как стадия заболевания, возраст, пол и вес индивидуума. Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Например, можно вводить один болюс, несколько разделенных доз можно вводить в течение периода времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно получать парентеральные композиции в единичной дозированной форме для удобства введения и единообразия дозировки. Используемый здесь термин "единичная дозированная форма" относится к физическим дискретным единицам, подходящим в качестве унифицированных доз для млекопитающих субъектов, подлежащих лечению; причем каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффек-

та в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация для единичная дозированная форма продиктована и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и (б) ограничений, налагаемых техникой приготовления такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

### 3. Дозы и способы введения.

Примерные дозы агентов (например, TRAIL<sub>пэг</sub>, DR антитело) включают в себя, например, от примерно 0,0001 до 5%, от примерно 0,0001 до 1%, от примерно 0,0001 до 0,1%, от примерно 0,001 до 0,1%, от примерно 0,005 до 0,1% от примерно 0,01 до 0,1%, от примерно 0,01 до 0,05% и от примерно 0,05 до 0,1%. Необязательно дозы включают в себя от примерно 0,001 до примерно 50%, от примерно 0,01 до примерно 5%, от примерно 0,1 до примерно 2,5%, от примерно 0,2 до примерно 2%, от примерно 0,3 до примерно 1,5%, от примерно 0,4 до примерно 1,25%, от примерно 0,5 до примерно 1%, от примерно 0,6 до примерно 0,9% и от примерно 0,7 до примерно 0,8% фармацевтической композиции или препарата. Примерные дозы также могут быть выражены пропорционально массе тела получающего лечение субъекта, например в мг/кг, например от примерно 0,0001 до примерно 1 г/кг, от 0,001 до примерно 1 г/кг, от примерно 0,01 до примерно 1 г/кг, от примерно 0,1 до примерно 1 г/кг, от примерно 0,2 до примерно 500 мг/кг, от 0,3 до примерно 200 мг/кг, от примерно 0,4 до примерно 100 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,6 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,7 до примерно 20 мг/кг, от примерно 0,8 до примерно 15 мг/кг, от примерно 1 до примерно 10 мг/кг, от примерно 2 до примерно 8 мг/кг и от примерно 4 до примерно 6 мг/кг.

Агонист рецептора смерти может вводиться системно, энтерально, парентерально, локально или при помощи буккальной доставки. При необходимости агонист рецептора смерти вводится локально. Локальное введение включает в себя местное и/или подкожное введение. Эффективное количество агониста(ов) может вводиться в виде одного введения или в виде одного или нескольких введений.

Агент(ы) (агонист(ы) рецепторов смерти) могут быть введены в эффективной дозе в одном или нескольких введениях. Каждое введение эффективной дозы агента (агентов) может быть разделено во времени по меньшей мере на 3 ч, по меньшей мере на 6 ч, по меньшей мере на 12 ч, по меньшей мере на 24 ч, по меньшей мере на 48 ч, по меньшей мере на 72 ч, по меньшей мере на 4 суток, по меньшей мере на 5 суток, по крайней мере на 6 суток, по меньшей мере на 7 суток, по меньшей мере на 2 недели, по меньшей мере на 3 недели или по меньшей мере на месяц.

Агент (агенты) могут быть введены таким способом, который продлевает продолжительность биодоступности химического соединения (соединений), увеличивает продолжительность действия агента(ов) и временного интервала высвобождения агента на величину, выбранную из группы, состоящей из по меньшей мере 3 ч, по меньшей мере 6 ч, по меньшей мере 12 ч, по меньшей мере 24 ч, по меньшей мере 48 ч, по меньшей мере 72 ч, по меньшей мере 4 суток, по меньшей мере 5 суток, по меньшей мере 6 суток, по меньшей мере 7 суток, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель и по меньшей мере месяца, но, по меньшей мере, на некоторую величину, которая превышает такую величину для агента(ов), когда он действует в отсутствие композиции, описанной в настоящем изобретении. При необходимости, продолжительность любого или всех предшествующих эффектов продлевается по меньшей мере на 30 мин, по меньшей мере на 1 ч, по меньшей мере на 2 ч, по меньшей мере на 3 ч, по меньшей мере на 6 ч, по меньшей мере на 12 ч, по меньшей мере на 24 ч, по меньшей мере на 48 ч, по крайней мере на 72 ч, по меньшей мере на 4 суток, по меньшей мере на 5 суток, по меньшей мере на 6 суток, по меньшей мере 7 суток, по меньшей мере на 2 недели, по меньшей мере на 3 недели или по меньшей мере на месяц.

Агент может быть включен в состав фармацевтической композиции, в которой этот агент является ее единственным активным агентом. Альтернативно фармацевтическая композиция может содержать дополнительные активные агенты. Например, два или более химических соединения могут быть использованы в комбинации. Кроме того, химическое соединение может быть комбинировано с одним или несколькими другими агентами, которые могут оказывать модулирующее действие на аутоиммунное заболевание (например, системный склероз).

### IV. Наборы.

Настоящее изобретение также включает в себя наборы, которые включают в себя эффективное количество агента, такого как агонист рецептора смерти (например, TRAIL<sub>пэг</sub> и DR антитела), и инструкции по его применению.

Наборы могут включать в себя эффективные дозы агентов в одном или нескольких стерилизованных, предварительно упакованных шприцах, капсулах, таблетках, порошках, гелях или пластырях, готовых для введения.

Наборы могут включать дополнительные агенты вместе с эффективными дозами агентов для комбинированной терапии.

Настоящее изобретение будет дополнительно описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не

должны рассматриваться как ограничивающие. Содержание всех ссылок, патентов и публикаций патентных заявок, упомянутых в тексте этой заявки, а также на чертежах, включено в настоящее изобретение путем ссылки.

### Примеры

Пример 1. Активированные фибробласты активируют рецепторы смерти (DR) и агонисты DR избирательно индуцируют апоптоз в активированных миофибробластах, но не в нормальных фибробластах.

Активированные,  $\alpha$ -SMA+ фибробласты (миофибробласты) являются одним из инициаторов склеродермии. Было определено, что избирательное устранение миофибробластов *in vivo* инвертирует течение СС и снимает воспаление. На сегодняшний день не существует клинически проверенных надежных методов направленного воздействия на миофибробласты у людей. TRAIL<sub>ПЭГ</sub> ранее идентифицировали в качестве агента, инвертирующего течение тяжелого фиброз в печени и поджелудочной железе путем направленного воздействия на  $\alpha$ -SMA+ активированные звездчатые клетки печени и поджелудочной железы (публикация международной заявки No. WO 2015/164217). В настоящем изобретении было показано, что TRAIL, TRAIL<sub>ПЭГ</sub> и DR5 антитела направленно воздействуют на  $\alpha$ -SMA+ миофибробласты, трансформированные из фибробластов, и одновременно ингибируют многие ключевые факторы СС. Когда первичные здоровые фибробласты кожи активировали TGF- $\beta$ 1 в течение 54 ч, в активированных фибробластах повышался уровень мРНК и белка  $\alpha$ -SMA, DR4, DR5 и фиброзных маркеров, включая коллаген (табл. 1 и 2). Важно отметить, что, когда активированные фибробласты обрабатывали рекомбинантным TRAIL (R&D Systems<sup>TM</sup>, 1 мкг/мл), TRAIL<sub>ПЭГ</sub> (1 мкг/мл) и DR5 антителами (1 мкг/мл, конатумумабом с G-белком и HGSTR2J/KMTRS) в течение 3 ч *in vitro*, только активированные миофибробласты показали повышенные уровни апоптотических маркеров, активную каспазу-8 и каспазу-3/7 и демонстрировали морфологические изменения, вызванные TRAIL-индуцированным апоптозом (табл. 3). Первичные фибробласты легких человека (ATCC<sup>®</sup> CCL-151) также активировали TGF- $\beta$ 1 (10 нг/мл) в течение 54 ч и затем обрабатывали TRAIL<sub>ПЭГ</sub>, и только активированные фибробласты легких проявляли морфологические изменения, вызванные TRAIL-индуцированным апоптозом. Следующие приведенные здесь примеры подтверждают эффективность TRAIL<sub>ПЭГ</sub> и DR антитела в моделях склеродермии, например фиброза кожи и легких.

Таблица 1. Уровни мРНК (относительная кратность) рецепторов смерти,  $\alpha$ -SMA (ACTA2) и коллагена в нормальных и TGF- $\beta$ 1 активированных первичных кожных фибробластах человека. \*\*\*P<0,001 по сравнению с нормальными фибробластами

Ген	Нормальные фибробласты	TGF- $\beta$ 1 активированные фибробласты
DR4	1, 0 $\pm$ 0, 1	9, 2 $\pm$ 1, 9***
DR5	1, 0 $\pm$ 0, 1	8, 5 $\pm$ 1, 3***
ACTA2	1, 0 $\pm$ 0, 1	4, 1 $\pm$ 0, 7***
Coll1A2	1, 0 $\pm$ 0, 1	9, 2 $\pm$ 4, 9***

Таблица 2. Уровни белка (относительная кратность) рецепторов смерти и  $\alpha$ -SMA в нормальных и TGF- $\beta$ 1 активированных первичных кожных фибробластах человека. \*\*P<0,01, \*\*\*p<0,001 по сравнению с нормальными фибробластами

Белок	Нормальные фибробласты	TGF- $\beta$ 1 активированные фибробласты
DR4	1, 0 $\pm$ 0, 1	2, 9 $\pm$ 0, 1***
DR5	1, 0 $\pm$ 0, 2	5, 1 $\pm$ 0, 9**
$\alpha$ -SMA	1, 0 $\pm$ 0, 1	1, 9 $\pm$ 0, 1***

Таблица 3. Активность каспазы-3/7 (маркер апоптоза) (относительная кратность) в нормальных фибробластах (норм.) и TGF- $\beta$ 1 активированных первичных кожных фибробластах человека (МФБ), обработанных TRAIL, TRAIL<sub>пэг</sub> и DR5 антителами (конатумумабом с G-белком и HGSTR2J/KMTRS). \*\*\*P<0,001 по сравнению с нормальными фибробластами

Активност ь	Норм . +ФС Б	Норм. + TRAIL <sub>пэг</sub> Г	МФБ +ФС Б	МФБ+ TRAI Л	МФБ+TR AIL <sub>пэг</sub>	МФБ+Конату мумаб	МФБ+ KMTR S
Каспаза- 3/7	1, 0±0 , 1	1, 3±0, 1	1, 2 ±0, 1	20, 0± 1, 5* **	28, 0±0 , 7***	25, 0±2, 5** *	30, 0 ±3, 5 ***

Пример 2. TRAIL<sub>пэг</sub> инвертирует утолщение кожи и отложение коллагена.

Дизайн исследования I (легкая форма фиброза в мышинных моделях СС, индуцированных блеомицином).

Для исследований *in vivo* использовали мышиную модель индуцированной блеомицином склеродермии. Мышам (DBA2/J) подкожно вводили блеомицин (день 0-28). TRAIL<sub>пэг</sub> (10, 20 мг/кг) или забуференный фосфатом физиологический раствор (ФСБ) вводили внутривентриально каждый день в течение двух недель с 15-го дня; n=5 особей в группе. Схема дизайна эксперимента изображена на фиг. 1. Образцы ткани из кожи и легкого отбирали на 28-й день модели и подготавливали для гистологии путем обработки формалином. Залитые парафином срезы тканей окрашивали гематоксилином-эозином (H&E). Срезы ткани также были проанализированы на наличие ряда фиброзных маркеров (коллаген,  $\alpha$ -SMA) при помощи иммуногистохимии. Гомогенаты тканей также были проанализированы на наличие фиброзных маркеров при помощи вестерн-блоттинга и ОТ-ПЦР.

Лечение TRAIL<sub>пэг</sub> инвертирует утолщение кожи до почти нормального состояния после 2-недельного лечения в мышинной модели склеродермии кожи

Для оценки влияния TRAIL<sub>пэг</sub> на мышиную модель склеродермии использовали модель блеомицином-индуцированного фиброза кожи. Для оценки лечения сформировавшегося фиброза инъекции TRAIL<sub>пэг</sub> были начаты через 2 недели после начала инъекций блеомицина. После лечения TRAIL<sub>пэг</sub> в течение 2 недель воспалительная клеточная инфильтрация была снижена у мышей, получавших TRAIL<sub>пэг</sub>. Количественная оценка показала, что толщина дермы была увеличена более чем на 70% у мышей с блеомицин-индуцированным фиброзом кожи по сравнению со здоровой кожей; однако введение TRAIL<sub>пэг</sub> таким мышам уменьшало увеличение толщины дермы и возвращало ее обратно к нормальным показателям (фиг. 2).

Лечение TRAIL<sub>пэг</sub> уменьшало отложение коллагена до почти нормальных значений после 2-недельного лечения в мышинной модели склеродермии кожи.

Поражение кожи при индуцированном блеомицином фиброзе показало плотное накопление толстых коллагеновых пучков в дерме, что отражает увеличение отложения коллагена. Однако мыши, получавшие TRAIL<sub>пэг</sub> на фоне продолжающегося повреждающего воздействия блеомицина, показали значительное снижение отложения коллагена. Срезы подвергали трихромному окрашиванию, что позволило обнаружить участки зрелого отложения коллагена. Поражения кожи у обработанных блеомицином мышей показали плотное накопление толстых коллагеновых пучков в дерме, что отражает увеличение отложения коллагена. Тем не менее, мыши, получавшие TRAIL<sub>пэг</sub> вместе с блеомицином, показали значительную инверсию отложения коллагена.

Чтобы изучить влияние TRAIL<sub>пэг</sub> на экспрессию гена коллагена *in vivo*, количество мРНК в пораженной коже определяли при помощи ПЦР в реальном времени. Результаты показали 3-кратное увеличение уровней мРНК CollA1 и CollA2 у мышей, обработанных блеомицином, по сравнению с нормальными мышами. Лечение TRAIL<sub>пэг</sub> заметно снижает экспрессию коллагеновой мРНК (фиг. 3).

Пример 3. TRAIL<sub>пэг</sub> направлено воздействует на источник СС.

Лечение TRAIL<sub>пэг</sub> значительно снижает активность  $\alpha$ -SMA+ клеточных популяций (например, активированных фибробластов, миофибробластов - инициаторы СС).

Экспрессию  $\alpha$ -SMA, маркера для идентификации миофибробластов, которые играют решающую роль в патологическом фиброгенезе, определяли при помощи иммуногистохимии. У мышей, обработанных блеомицином, повышенный уровень  $\alpha$ -SMA отмечался в пораженной дерме и подкожных слоях. Лечение TRAIL<sub>пэг</sub> значительно уменьшило количество  $\alpha$ -SMA+ фибробластных клеток. У мышей, обработанных блеомицином, повышенный уровень  $\alpha$ -SMA отмечался в пораженной дерме и подкожных слоях. Лечение TRAIL<sub>пэг</sub> значительно уменьшило количество  $\alpha$ -SMA+ фибробластных клеток. Уровни  $\alpha$ -SMA белка и экспрессирующего его гена были подтверждены при помощи вестерн-блоттинга и ПЦР анализа в реальном времени соответственно.

Пример 4. Влияние TRAIL<sub>пэг</sub> на экспрессию трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF-β1) и рецептора смерти 5 (DR5).

Лечение TRAIL<sub>пэг</sub> показало, что склеродермия кожи может быть инвертирована в моделях *in vivo*.

Трансформирующий фактор роста является ключевым медиатором фиброза при различных фиброзных расстройствах, а также у животных-моделей индуцированного блеомицином фиброза. Чтобы оценить изменение экспрессии TGF-β1 под действием TRAIL<sub>пэг</sub> *in vivo*, уровень мРНК TGF-β1 исследовали на пораженной коже. Введение TRAIL<sub>пэг</sub> в значительной степени предотвращало повышение уровня мРНК TGF-β1 (фиг. 4).

Пример 5. TRAIL<sub>пэг</sub> инвертирует развитие фиброза легких.

Лечение TRAIL<sub>пэг</sub> подавляет стимуляцию коллагена и миофибробластов при легочном фиброзе легких. Чтобы исследовать влияние TRAIL<sub>пэг</sub> на экспрессию коллагена и α-SMA при индуцированном блеомицином фиброзе легких, мРНК в легких определяли количественно при помощи ПЦР в реальном времени. Результаты показали увеличение уровня мРНК CollA1 более чем на 50% (фиг. 5) у мышей, обработанных блеомицином, по сравнению с нормальными мышами. Лечение TRAIL<sub>пэг</sub> заметно ослабляло активацию экспрессии мРНК коллагена.

TRAIL<sub>пэг</sub> ослабляет экспрессию тромбоцитарного фактора роста (PDGF) при блеомицин-индуцированном фиброзе легких.

PDGF играет ключевую роль в распространении миофибробластов, стимулируя их миграцию и выживание. Повышенные уровни PDGF всегда имеют место при фиброзных поражениях легких. Чтобы исследовать влияние лечения TRAIL<sub>пэг</sub> на экспрессию PDGF в блеомицин-индуцированных легких, мРНК в легких определяли количественно при помощи ПЦР в реальном времени. Результаты показали увеличение уровней мРНК PDGFα (фиг. 6A) и PDGFβ (фиг. 6B) у мышей, которым вводили блеомицин, по сравнению с нормальными мышами. Лечение TRAIL<sub>пэг</sub> заметно ослабляло активацию экспрессии мРНК PDGF.

Пример 6. TRAIL<sub>пэг</sub> инвертирует развитие выраженного фиброза в блеомицин-индуцированных мышечных моделях СС.

Дизайн исследования II (выраженный фиброз в блеомицин-индуцированных мышечных моделях СС).

Для дополнительного подтверждения антифибротической эффективности агонистов DR в отношении выраженного фиброза в мышечных моделях СС мышам (DBA2/J) подкожно вводили блеомицин в течение трех недель (день 0-21), чтобы вызвать у них развитие фиброза кожи, и затем вводили им агонисты DR или ФСБ в течение дополнительных трех недель. TRAIL<sub>пэг</sub> (5 мг/кг) или ФСБ внутривенно вводили через день в течение трех недель (день 22-42, n=7-10 особей в группе). Образцы тканей отбирали в день 43 и анализировали, как описано выше. Содержание гидроксипролина (маркера коллагена) измеряли с помощью набора реагентов для анализа (Sigma). Кроме того, срезы кожи были проанализированы на наличие ряда фиброгенных маркеров (коллаген, α-SMA) с использованием иммуногистохимии. Гомогенаты тканей анализировали при помощи вестерн-блоттинга и ОТ-ПЦР для DR5, α-SMA, TGF-β1, коллагена, PDGFR и PDGF. Для подтверждения апоптоза, индуцированного TRAIL, активность каспазы-8 и каспазы-3/7 в тканях кожи измеряли с использованием наборов реагентов для анализа.

Результаты.

Инъекция блеомицина индуцировала выраженный фиброз кожи с утолщением дермы, отложение коллагена, потерей внутрикожной жировой ткани, густыми воспалительными инфильтратами и дифференцировкой миофибробластов. Длительное введение блеомицина в течение 6 недель повышает тяжесть фиброза кожи по сравнению с инъекциями блеомицина в течение 3 недель с последующей инъекцией NaCl в течение дополнительных 3 недель. Лечение TRAIL<sub>пэг</sub>, начатое после 3 недель инъекций блеомицина, уменьшило интенсивность прогрессирования фиброза со значительным снижением воспалительной инфильтрации, толщины кожи, содержания гидроксипролина и количества миофибробластов по сравнению с мышами, получавшими ФСБ, которым вводили блеомицин в течение 3 недель (табл. 4). Кроме того, TRAIL<sub>пэг</sub> уменьшал экспрессию маркеров фиброза (уровни мРНК ACTA2, TGF-β1, CollA1, CollA2, PDGFR-β и PDGFα) в образцах до начала формирования фиброза кожи (табл. 5). Также было обнаружено, что уровни мРНК DR5 были значительно выше у мышей, получавших блеомицин, по сравнению с мышами, получавшими ФСБ. Было подтверждено увеличение апоптоза, индуцированного TRAIL, в коже получавших TRAIL<sub>пэг</sub> мышей с индуцированным блеомицином СС, но не в коже здоровых мышей (табл. 6).

Таблица 4. Влияние TRAIL<sub>пэг</sub> на индуцированный блеомицином фиброз кожи (относительная кратность). \*\*\*P<0,001 по сравнению с нормой+ФСБ, ##P<0,01, ###P<0,001 по сравнению с блеомицином+ФСБ

	Норма		Блеомицин	
	ФСБ	TRAIL <sub>пэг</sub> 5 мг/кг	ФСБ	TRAIL <sub>пэг</sub> 5 мг/кг
Толщина кожи	1 ± 0,1	1,2±0,1	2,7±0,4** *	1,4±0,4###
Гидроксипролин	1 ± 0,2	1,3±0,3	2,±0,5***	1,4±0,5##
Кол-во миофибробластов	1,0 ± 0,2	1,3±0,1	3,4±1,2** *	0,9±0,2###

Таблица 5. Анализ при помощи ПЦР в реальном времени (относительная кратность) уровней мРНК DR5, ACTA2, TGF-β1, CollA1, CollA2, PDGFR-β и PDGFα в коже. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 по сравнению с нормой+ФСБ, #P<0,05, ###P<0,001 по сравнению с блеомицином+ФСБ

Ген	Норма		Блеомицин	
	ФСБ	TRAIL <sub>пэг</sub> 5 мг/кг	ФСБ	TRAIL <sub>пэг</sub> 5 мг/кг
DR5	1,1±0,4	1,1±0,5	3,5±3,4*	4,3±2,1***
ACTA2 (α-SMA)	1,1±0,5	1,2±0,4	4,4±1,7***	0,8±0,4###
TGF-β1	1,2±0,6	1,1±0,3	2,5±0,7***	1,3±0,5###
CollA1	1,1±0,6	0,8±0,3	1,5±0,3***	0,2±0,2###
CollA2	1,1±0,5	1,5±0,5	2,8±1,3***	0,6±0,7###
PDGFRβ	1,1±0,4	0,9±0,1	2,1±1,2***	1,5±0,8#
PDGFα	1,1±0,4	0,9±0,3	1,8±0,2***	1,0±0,3###

Таблица 6. Активность каспазы-8 и -3/7 в коже мышей контрольных групп и мышей с индуцированным блеомицином фиброзом кожи, получавших TRAIL<sub>пэг</sub>. \*P<0,05, \*\*P<0,01 по сравнению с нормой+ФСБ

Активность	Норма		Блеомицин	
	ФСБ	TRAIL <sub>пэг</sub> 5 мг/кг	ФСБ	TRAIL <sub>пэг</sub> 5 мг/кг
Каспаза-8	1,0±0,6	1,1±0,5	2,1±0,7	4,0±1,7*
Каспаза- 3/7	1,0±0,6	1,3±0,5	1,9±0,5	4,0±1,8**

Пример 7. Агонист DR (TRAIL<sub>пэг</sub>) уменьшает интенсивность фиброза в трансгенных мышинных моделях CC Tight skin-1 (TSK-1).

Изучали влияния агониста DR (TRAIL<sub>пэг</sub>) у мышей TSK-1. Фенотип TSK-1 обусловлен доминантной мутацией в гене фибриллина 1, что приводит к CC-подобному заболеванию с незначительными инфильтратами, синтезом аутоантител и фиброзом кожи. Эта модель имитирует более поздние стадии фиброза кожи с меньшим воспалением. Мышей TSK-1 были приобретены в лаборатории JAXα). Лечение было начато в возрасте 5 недель и результат изучали в возрасте 10 недель. TRAIL<sub>пэг</sub> (5 мг/кг) или ФСБ вводили внутривенно через день мышам дикого типа (ДТ) или мышам TSK-1 в течение пяти недель (неделя 5-10, n=7-10 особей в группе). Как показано в табл. 7, у мышей TSK-1 наблюдали повышенные толщину кожи, содержание гидроксипролина (маркер коллагена) и увеличенную популяцию клеток α-SMA+ миофибробластов по сравнению с этими показателями у контроля (дикий тип, ДТ). Лечение мышей TSK-1 TRAIL<sub>пэг</sub> (1 мг/кг) в течение 5 недель уменьшало гиподермальное утолщение, содержание гидроксипролина и количество миофибробластов кожи по сравнению с мышами TSK-1, получавшими ФСБ.

Таблица 7. Влияние TRAIL<sub>ПЭГ</sub> У мышей TSK-1 (относительная кратность). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 по сравнению с ДТ+ФСБ, #P<0,05, ###P<0,001 по сравнению с TSK-1 + ФСБ

	ДТ	TSK-1	
	ФСБ	ФСБ	TRAIL <sub>ПЭГ</sub> 1 мг/кг
Толщина кожи	1,0±0,5	2,7±1,2**	1,8±0,7#
Гидроксипролин	1,0±0,2	1,4±0,2***	1,1±0,7###
Миофибробласты	1,0±0,4	2,3±1,0*	1,2±0,6#

Пример 8. DR-антитело (MD5-1, мышинное анти-DRS антитело) инвертирует развитие выраженного фиброза в мышинных моделях индуцированного блеомицином СС.

Для дополнительного подтверждения антифиброзной эффективности агонистического антитела к DR в мышинных моделях выраженного фиброза, описанных в дизайне исследования II, мышам (DBA2/J) подкожно вводили блеомицином в течение трех недель (день 0-21), чтобы вызвать фиброз кожи, и далее вводили антитело к DR5 (100 мкг на мышь), IgG (контроль) или ФСБ через день в течение дополнительных трех недель (день 22-42, n=7-10 особей в группе).

Образцы тканей отбирали в день 43 и анализировали, как описано выше. Измеряли толщину кожи и содержание гидроксипролина (маркера коллагена), а также размер популяции клеток  $\alpha$ -SMA+ миофибробластов, как описано выше. Гомогенаты тканей анализировали при помощи ОТ-ПЦР для  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, коллагена, PDGFR и PDGF. Для подтверждения апоптоза, индуцированного TRAIL, активность каспазы-8 и каспазы-3/7 в тканях кожи измеряли с использованием наборов реагентов для анализа.

Результаты.

Лечение анти-DR5-антителом (MD5-1) в течение 3 недель у мышей СС с предварительно индуцированным фиброзом уменьшало интенсивность фиброза кожи со значительным уменьшением толщины кожи, содержания гидроксипролина и количества миофибробластов (табл. 8). Кроме того, введение MD5-1 существенно уменьшало уровень мРНК ACTA2 ( $\alpha$ -SMA), CollA1, CollA2, TGF- $\beta$ 1, PDGFR- $\beta$  и PDGF $\alpha$  при предварительно индуцированном фиброзе (табл. 9). Был подтвержден DR-опосредованный апоптоз с участием MD5-1 при помощи анализа активности каспазы-8 и каспазы-3/7 (табл. 10).

Таблица 8. Влияние DR агонистического антитела (MD5-1) у мышей с индуцированным блеомицином СС (относительная кратность). \*\*\*P<0,001 по сравнению с нормой+IgG, ###P<0,001 по сравнению с блеомицин+IgG

	Норма	Блеомицин	
	IgG	IgG	Анти-DR5-антитело
Толщина кожи	1,0±0,1	2,6±0,5***	1,3±0,2###
Гидроксипролин	1,0±0,2	1,9±0,7***	0,9±0,3###
Миофибробласты	1,0±0,2	3,4±1,2***	1,3±0,4###

Таблица 9. Анализ при помощи ПЦР в реальном времени (относительная кратность) уровней мРНК ACTA2, TGF- $\beta$ 1, CollA1, CollA2, PDGFR- $\beta$  и PDGF $\alpha$  в коже. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 по сравнению с нормой+IgG, ###P<0,001 по сравнению с блеомицином+IgG

Ген	Норма	Блеомицин	
	IgG	IgG	Анти-DR5-антитело
ACTA2	1,0±0,3	3,1±0,8***	0,6±0,3###
TGF- $\beta$ 1	1,0±0,2	1,3±0,2***	0,3±0,1###
CollA1	1,0±0,4	2,7±1,5**	0,1±0,1###
CollA2	1,0±0,2	1,8±0,7***	0,2±0,1###
PDGFR $\beta$	1,0±0,2	1,9±1,1*	0,4±0,1###
PDGF $\alpha$	1,0±0,2	2,0±0,5***	1,0±0,4###

Таблица 10. Активность каспазы-8 и -3/7 в коже мышц контрольных групп и мышеч с индуцированным блеомицином фиброзом кожи, получавших DR антитело.  
\*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, по сравнению с нормой+IgG

Активность	Норма	Блеомицин	
		IgG	Анти-DR5-антитело
Каспаза-8	1, 0±0, 5	2, 4±0, 9	3, 5±1, 2***
Каспаза-3/7	1, 0±0, 5	1, 7±0, 4	2, 6±1, 1**

Другие варианты осуществления изобретения.

Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано в рамках его подробного описания, приведенное выше описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в объеме следующей формулы изобретения.

В упомянутой здесь патентной и научной литературе описаны знания, которые доступны специалистам в данной области. Все патенты США и опубликованные или неопубликованные заявки на патент США, приведенные здесь, включены в настоящее изобретение путем ссылки. Все опубликованные зарубежные патенты и заявки на патент, приведенные здесь, включены в настоящее изобретение путем ссылки. Приведенные здесь данные из баз данных Genbank и NCBI, указанные регистрационным номером, включены в настоящее изобретение путем ссылки. Все остальные опубликованные ссылки, документы, рукописи и научная литература, приведенные здесь, включены в настоящее изобретение путем ссылки.

Несмотря на то, что настоящее изобретение, в частности, было показано и описано со ссылками на предпочтительные варианты его осуществления, специалистам в данной области техники будет понятно, что в него могут быть внесены различные изменения в форме и деталях, не выходя за пределы объема изобретения, охватываемого прилагаемой формулой изобретения.

Эквиваленты.

Специалистам в данной области техники известно, или они смогут установить при помощи не более чем обычных экспериментов многие эквиваленты описанных здесь конкретных вариантов осуществления изобретения. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются следующей формулой изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или профилактики системного склероза (СС) у млекопитающего субъекта, включающий введение субъекту агониста рецептора смерти, содержащего связанный с фактором некроза опухоли (ФНО) индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL), TRAIL<sub>ПЭГ</sub> или антитело против DR5, в количестве, эффективном для блокирования или истощения активированных миофибробластов, осуществляя тем самым лечение СС у этого субъекта.

2. Способ по п.1, где активированные миофибробласты представляют собой TGF-β1-активированные миофибробласты.

3. Способ по п.1, где СС представляет собой ограниченную склеродермию или диффузную склеродермию.

4. Способ по п.1, где агонист рецептора смерти включает в себя рекомбинантный TRAIL человека или аналог TRAIL человека.

5. Способ по п.1, где агонист рецептора смерти включает в себя нативный TRAIL или аналог нативного TRAIL.

6. Способ по п.1, где агонист рецептора смерти включает в себя агонист DR5, выбранный из группы, состоящей из лексатумумаба, тигатумумаба, конатумумаба, дрозитумаба, HGSTR2J/KMTRS, LBY-135 и одноцепочечного TRAIL-рецептор-связывающего домена (scTRAIL-RBD).

7. Способ по п.1, где агонист рецептора смерти включает в себя поливалентный агонист DR, выбранный из группы, состоящей из TAS266 и TRAIL-RBDs.

8. Способ по любому из пп.1-7, где агонист рецептора смерти избирательно присоединен к полимеру.

9. Способ по п.8, где полимер содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ) или его производное.

10. Способ по п.9, где ПЭГ или производное ПЭГ выбраны из группы, состоящей из метоксиполиэтиленгликоль сукцинимидилпропионата, метоксиполиэтиленгликоль сукцинат N-гидроксисукцинимид, метоксиполиэтиленгликоль пропиональдегида, малеимида метоксиполиэтиленгликоля и многоветвленного полиэтиленгликоля.

11. Способ по п.9, где ПЭГ или его производное имеет молекулярную массу от 1000 до 100000 Да.

12. Способ по п.9, где ПЭГ или его производное имеет молекулярную массу от 5000 до 50000 Да.

13. Способ по любому из пп.1-12, где агонист рецептора смерти вводят системно.

14. Способ по любому из пп.1-12, где агонист рецептора смерти вводят локально.

15. Способ по любому из пп.1-12, где агонист рецептора смерти вводят подкожно.

16. Способ по любому из пп.1-15, где введение эффективного количества агониста рецептора смер-

ти уменьшает толщину кожи, уровни содержания коллагена в коже, уровни TGF- $\beta$ , PDGFR, PDGF, IL-6 и/или снижает количество  $\alpha$ -SMA+ фибробластных клеток по сравнению с соответствующим контролем.

17. Способ по любому из пп.1-16, где фиброз у субъекта лечится или предотвращается по сравнению с соответствующим контролем.

18. Способ по любому из пп.1-17, где агонист рецептора смерти вводят субъекту путем инъекции в дозе от 0,001 до 50 мг/кг.

19. Способ по любому из пп.1-18, где эффективное количество агониста рецептора смерти вводят в одной или нескольких дозах.

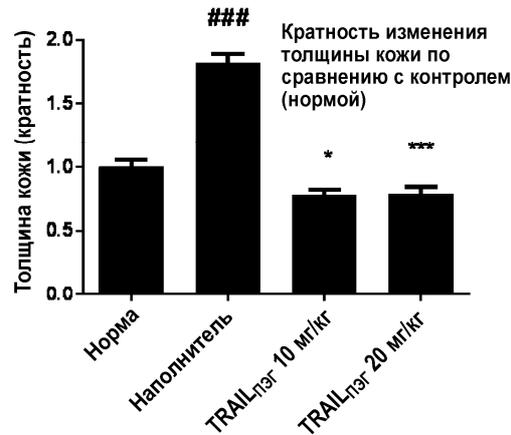
20. Способ по любому из пп.1-19, где эффективное количество агониста рецептора смерти вводят субъекту в течение одного или нескольких дней.

21. Способ по любому из пп.1-20, где субъект является человеком.

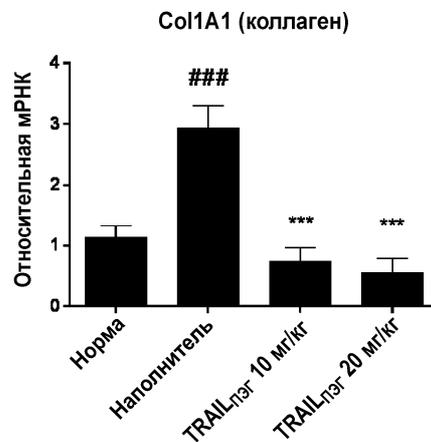
22. Способ лечения или предотвращения системного склероза (СС) у млекопитающего субъекта, включающий введение субъекту инъекционной фармацевтической композиции, содержащей агонист рецептора смерти, включающий TRAIL, TRAIL<sub>пэг</sub> или антитело против DR5, в концентрации от 0,001% до 50%, и фармацевтически приемлемый носитель.



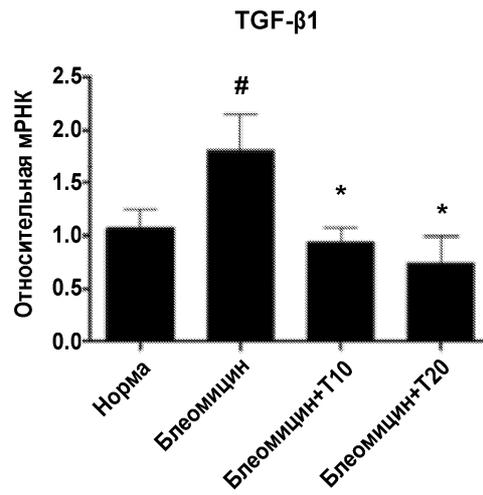
Фиг. 1



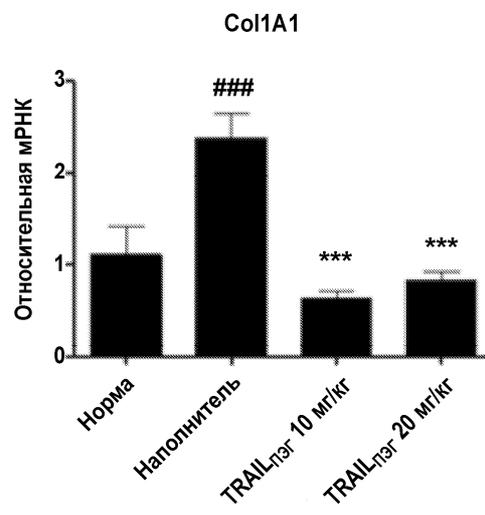
Фиг. 2



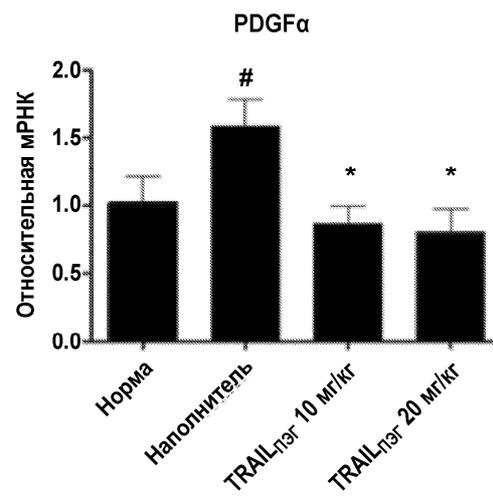
Фиг. 3



Фиг. 4

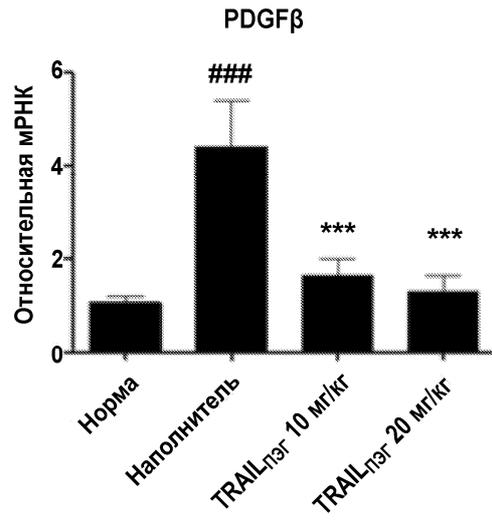


Фиг. 5



Фиг. 6А

038551



Фиг. 6В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2

---