



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.20

(21) Номер заявки
201892260

(22) Дата подачи заявки
2017.04.07

(51) Int. Cl. **A61K 38/19** (2006.01)
A61P 1/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПАНКРЕАТИТА И БОЛИ С ПРИМЕНЕНИЕМ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА СМЕРТИ

(31) 62/319,454

(32) 2016.04.07

(33) US

(43) 2019.03.29

(86) PCT/US2017/026617

(87) WO 2017/177148 2017.10.12

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

(72) Изобретатель:
**Ли Сеулки, Помпер Мартин Г., Парк
Оджи, Сверчевская Магдалена,
Пасрича Панкадж Дж. (US)**

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

(56) WO-A1-2015164217
DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; April 2016 (2016-04), ZHU YAOHUI ET AL: "A Novel Therapeutic Approach Targeting TRAIL Signaling Reveals a Role for Activated Pancreatic Stellate Cells in the Pathogenesis of Pain in Chronic Pancreatitis", XP002771084, Database accession no. PREV201700279330 abstract & GASTROENTEROLOGY, vol. 150, no. 4, Suppl. 1, April 2016 (2016-04), pages S916-S917, DIGESTIVE

DISEASE WEEK (DDW); SAN DIEGO, CA, USA; MAY 21-24, 2016 ISSN: 0016-5085(print)

US-A1-2005203142

WO-A1-2006028939

WO-A2-2011106707

WO-A1-2007145457

YU SEOK YOUN ET AL: "PEGylated apoptotic protein-loaded PLGA microspheres for cancer therapy", INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, vol. 2015, 19 January 2015 (2015-01-19), pages 739-739, XP055381041, DOI: 10.2147/IJN.S75821

TAE HYUNG KIM ET AL: "PEGylated TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Analogues: Pharmacokinetics and Antitumor Effects", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 22, no. 8, 17 August 2011 (2011-08-17), pages 1631-1637, XP055098112, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc200187k

MADHURI BAJAJ ET AL: "Conatumumab: a novel monoclonal antibody against death receptor 5 for the treatment of advanced malignancies in adults", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, vol. 11, no. 11, 31 August 2011 (2011-08-31), pages 1519-1524, XP055381429, ASHLEY, LONDON; GB ISSN: 1471-2598, DOI: 10.1517/14712598.2011.610788

LEE SEULKI ET AL: "A Novel Trail-Based Therapy for Chronic Pancreatitis", GASTROENTEROLOGY, vol. 152, no. 5, April 2017 (2017-04), XP029979046, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1016/S0016-5085(17)30435-3 abstract

(57) Были разработаны композиции агониста рецептора смерти 5 (DR5) и способы лечения панкреатита. Композиции включают родственный фактору некроза опухоли лиганд, вызывающий апоптоз (TRAIL), его аналоги и агонистические антитела против DR5. В некоторых вариантах осуществления аналоги TRAIL и агонистические антитела против рецептора смерти 5 обладают обезболивающим и модифицирующим заболевание действием в отношении поджелудочной железы.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущества и приоритет предварительной заявки на патент США 62/319,454, поданной 7 апреля 2016 года, которая настоящим полностью включена посредством отсылки.

Сведения относительно исследований или разработок, спонсируемых из федерального бюджета.

Настоящее изобретение было сделано при правительственной поддержке по W81XWH-15-1-0301 и W81XWH-15-1-0302, предоставленным Министерством обороны США (DOD) и R21AA023855, предоставленным Национальными институтами здравоохранения США. Правительство обладает определенными правами на изобретение.

Уровень техники

Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) является группой цитокиновых рецепторов, которые отличаются способностью связывать факторы некроза опухоли (ФНО) посредством внеклеточного богатого цистеином домена. За исключением фактора роста нервов (NGF), все ФНО гомологичны типичному представителю семейства - ФНО-альфа. В своей активной форме большинство рецепторов ФНО формируют тримерные комплексы в плазматической мембране. Соответственно, большинство рецепторов ФНО содержат трансмембранные домены (ТМД), хотя некоторые могут расщепляться с образованием растворимых форм (например, TNFR1), а некоторые вообще не имеют ТМД (например, DcR3). Кроме того, большинство рецепторов ФНО требуют наличия определенного адаптерного белка, такого как TRADD, TRAF, RIP и FADD, для передачи сигналов. Рецепторы ФНО, прежде всего, участвуют в апоптозе и воспалении, но они также могут участвовать в других путях передачи сигналов, таких как пролиферация, выживание и дифференцировка. Рецепторы ФНО экспрессируются в различных тканях млекопитающих, особенно в лейкоцитах.

Термин рецептор смерти относится к представителям суперсемейства рецептора ФНО, которые содержат домен смерти, такой как TNFR1, рецептор Fas, DR4 и DR5. Они были названы по имени своей роли в апоптозе (программируемой клеточной смерти), хотя у них, как теперь известно, есть и другие функции.

Термин рецептор ФНО часто используется для обозначения типичных членов суперсемейства, а именно TNFR1 и TNFR2, которые распознают ФНО-альфа. Существует 27 членов семейства, включающих: рецептор фактора некроза опухоли 1, рецептор фактора некроза опухоли 2, рецептор лимфотоксина-бета, OX40, CD40, рецептор Fas, рецептор-приманку 3, CD27, CD30, 4-1BB, рецептор смерти 4 (DR4), рецептор смерти 5 (DR5), рецептор-приманку 1, рецептор-приманку 2, RANK, остеопротегерин, рецептор TWEAK, TACI, рецептор BAFF, медиатор проникновения вируса герпеса, рецептор фактора роста нервов, антиген созревания В-клеток, индуцируемый глюкокортикоидами TNFR-родственный, TROY, рецептор смерти 6, рецептор смерти 3 и рецептор эктодисплазина-A2.

Панкреатит, острый или хронический, согласно нескольким исследованиям является значительным фактором, оказывающим влияние на "бремя желудочно-кишечных болезней" в США. Хронический панкреатит (ХП) - тяжелое последствие злоупотребления алкоголем и характеризуется прогрессирующим и необратимым разрушением структуры и функции поджелудочной железы. ХП сопровождается фиброзом поджелудочной железы и постоянной болью в животе. Боль при ХП очень плохо поддавалась лечению. Отсутствие понимания первопричинной биологии привело к различным эмпирическим подходам, которые часто основаны исключительно на анатомических участках и обычно являются высокоинвазивными.

Поэтому существует значительная неудовлетворенная потребность в терапевтических стратегиях лечения панкреатита.

Цель изобретения состоит в предоставлении композиции для лечения панкреатита, фиброза поджелудочной железы и боли в поджелудочной железе.

Другая цель изобретения состоит в предоставлении способов лечения панкреатита, фиброза поджелудочной железы и боли в поджелудочной железе.

Сущность изобретения

Был разработан способ лечения панкреатита и сопутствующих нарушений, таких как боль, с применением агонистов рецептора смерти, например, рекомбинантных аналогов человеческого TRAIL или агонистических антител против рецептора смерти 5 (DR5). Рекомбинантные аналоги ФНО (фактор некроза опухоли)-родственного лиганда, вызывающего апоптоз (TRAIL), и антитела против DR5 селективно воздействуют на активированные звездчатые клетки поджелудочной железы и уменьшают воспаление, фиброгенез и боль, а также улучшают функции поджелудочной железы при остром и хроническом панкреатите у нуждающихся в этом пациентов.

Способы лечения панкреатита или боли в поджелудочной железе и улучшения функций поджелудочной железы включают введение субъекту, страдающему или подверженному риску развития панкреатита, фиброза поджелудочной железы или нарушения, например, боли в поджелудочной железе, фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество агониста рецептора смерти. Подходящие агонисты рецептора смерти включают, без ограничения перечисленными, агонисты TRAIL-R2 (рецептор смерти 5), такие как рекомбинантный человеческий (rh) TRAIL, аналоги rhTRAIL, сконструированные аналоги TRAIL, белки TRAIL длительного действия, модифицированные, например, полимерами, такими как полиэтиленгликоль, сополимеры и разветвленные аналоги и биополимеры, такие как гиалуроно-

вая кислота. Лекарственные формы длительного действия на основе TRAIL, включающие слитые белки TRAIL, агонистические антитела против TRAIL-R2 и агонистические малые молекулы или молекулы пептидов, связывающие TRAIL-R2. TRAIL-R2 (DR5), но не DR4, является основным рецептором, вызывающим селективный апоптоз в активированных звездчатых клетках поджелудочной железы, как продемонстрировано в примере 3.

В предпочтительных вариантах осуществления TRAIL является rhTRAIL (т.е. рекомбинантным человеческим TRAIL) или его функциональным фрагментом или вариантом, например, фрагментом из 281 аминокислоты TRAIL человека. В предпочтительных вариантах осуществления фрагмент имеет аминокислотную последовательность от 114 до 281 или от 95 до 281 из полноразмерной человеческой формы длиной 281 аминокислота. В предпочтительных вариантах осуществления rhTRAIL длительного действия представляет собой ПЭГилированный белок фактора некроза опухоли (ФНО)-родственного лиганда, вызывающего апоптоз (TRAIL), производное ПЭГилированного TRAIL или их любую комбинацию. В предпочтительных вариантах осуществления антитела против рецептора смерти являются агонистическими антителами против рецептора смерти 5. В примерном аспекте агонисты рецептора смерти содержат ПЭГилированный аналог TRAIL и агонистические антитела против DR5.

Также в настоящей заявке предложены агонисты рецептора смерти и один или более молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ) или их производные. В некоторых случаях агонист рецептора смерти включает ПЭГилированный аналог TRAIL или его производное.

В одном аспекте молекула ПЭГ или производное выбраны из группы, состоящей из линейного ПЭГ, разветвленного ПЭГ, звездообразного ПЭГ, гребнеобразного ПЭГ, дендримерного ПЭГ, ПЭГ сукцинимидилпропионата, ПЭГ N-гидроксисукцинимид, ПЭГ пропиональдегида, ПЭГ малеимида, линейного метоксиполиэтиленгликоля (мПЭГ), разветвленного мПЭГ, звездообразного мПЭГ, гребнеобразного мПЭГ, дендримерного мПЭГ, мПЭГ сукцинимидилпропионата, мПЭГ N-гидроксисукцинимид, мПЭГ пропиональдегида и мПЭГ малеимида. В некоторых случаях разветвленная молекула ПЭГ или производное включают мономерные, димерные и/или тримерные молекулы ПЭГ или их производные. В некоторых случаях молекула ПЭГ или производное являются тримерным метоксиполиэтиленгликоль малеимидом.

Молекула ПЭГ имеет молекулярную массу по меньшей мере 1000 дальтон, при измерении с помощью эксклюзионной хроматографии или масс-спектрометрии МАЛДИ-ВП. В некоторых случаях молекула ПЭГ включает молекулу ПЭГ со средней молекулярной массой приблизительно 1000-1000000 дальтон, средней молекулярной массой приблизительно 10000-500000 дальтон, средней молекулярной массой приблизительно 1000-100000 дальтон, наиболее предпочтительно 5000-50000 дальтон. В других случаях молекула ПЭГ включает молекулу ПЭГ со средней молекулярной массой приблизительно 20000-250000 дальтон, средней молекулярной массой приблизительно 30000-100000 дальтон или молекулу ПЭГ со средней молекулярной массой приблизительно 40000-80000 дальтон.

Также предложены композиции, содержащие антитело против DR5 конатумумаб, тигатузумаб, лексатумумаб, HGS-TR2J/KMTR-2, LBY135, дрозитумаб, TAS266, DS-8273/DS-8273a, APG880 или RG7386.

Примеры заболеваний или нарушений включают острый или хронический панкреатит, связанную с панкреатитом боль и фиброз поджелудочной железы, а также связанную с фиброзом боль. В некоторых случаях фиброз поджелудочной железы включает десмоплазию в микроокружении опухоли в поджелудочной железе. В примере осуществления фиброзным нарушением является связанная с фиброзом боль. В некоторых случаях способы дополнительно включают идентификацию пациента, страдающего или подверженного риску связанной с фиброзом боли.

Подходящие способы введения включают инъекцию, в том числе внутривенную и подкожную, ингаляцию, пульмональное, назальное и возможно внутриглазное введение. Композиции могут вводить в дозе 0,001-100 мг/кг, например 0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мг/кг. Предпочтительно композиции вводят в дозе 0,2-20 мг/кг или дозе 0,001-20 мг/кг. Лекарственные формы вводят в дозе и в течение периода времени, которые обеспечивают защиту ткани поджелудочной железы, уменьшение образования фиброзной ткани, регрессию фиброгенеза поджелудочной железы, уменьшение боли и сохранение здоровых тканей поджелудочной железы неповрежденными. В одном аспекте лечение фиброзного заболевания или нарушения включает уменьшение воспаления.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 является схемой, на которой показана роль агонистов рецептора смерти (DR), например аналогов TRAIL или агонистических антител против DR, в моделях панкреатита. Агонисты рецепторов смерти селективно воздействуют на активированные панкреатические звездчатые клетки (ПЗК) в поджелудочной железе, оставляя другие ткани целыми. Активированные ПЗК являются одним из инициаторов фиброза и боли в поджелудочной железе. Путем селективного блокирования активации ПЗК и/или устранения активированных ПЗК, агонисты рецепторов смерти уменьшают фиброз и боль, что приводит к восстановлению ткани поджелудочной железы.

Фиг. 2 является гистограммой, на которой показан процент жизнеспособных клеток (%) первичных человеческих островковых и крысиных ацинарных клеток при обработке клеток 10, 100, 1000 нг/мл

TRAIL-ПЭГ. Никакой токсичности в отношении нормальных клеток поджелудочной железы, включающих первичные человеческие островковые и ацинарные клетки поджелудочной железы, не обнаружили. TRAIL-ПЭГ (10, 100, 1000 нг/мл) инкубировали с различными клетками в течение 24 ч и количественно определяли некроз клеток с помощью МТТ-тестов.

Фиг. 3А, 3В, 3С, 3D, 3Е и 3F являются гистограммами, на которых показана относительная экспрессия указанных генов активированными в культуре первичными человеческими ПЗК в дни 2, 4, и 7 культивирования. В активированных в культуре первичных человеческих ПЗК апрегулированы Acta2 (α -SMA, маркер активированных звездчатых клеток), фиброгенные маркеры и рецепторы TRAIL (DR5/DR4), при этом они становятся очень чувствительными к TRAIL-индуцируемому апоптозу. Анализ кПЦР покоящихся (день 2) и активированных ПЗК (день 4 и день 7). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ в сравнении с днем 2.

Фиг. 4 является гистограммой, на которой показан процент погибших клеток (%) в активированных в культуре первичных человеческих ПЗК в дни 1, 2, 4 и 7 культивирования. * $P < 0,05$.

Фиг. 5 является гистограммой, на которой показано изменение (кратное) активности каспазы 3/7 (эффектора апоптоза) в активированных в культуре ПЗК, которые были обработаны указанными концентрациями мапатумумаба (агонистического антитела против DR4, 0-103 нг/мл) или конатумумаба (агонистического антитела против DR5, 0-103 нг/мл). Только конатумумаб вызывает апоптоз в активированных ПЗК. Это указывает, что DR5, а не DR4, играет решающую роль в TRAIL сигнализации в активированных звездчатых клетках. *** $P < 0,001$ в сравнении с необработанными ПЗК.

Фиг. 6А и 6В являются графиками, на которых показаны профили экспрессии DR4 или DR5 на клеточной мембране покоящихся ПЗК (день 2) и активированных ПЗК (день 7), измеренные с помощью проточной цитометрии при использовании ФЭ-меченых антител к рецептору смерти. DR5 преобладающе экспрессируется на клеточной поверхности активированных ПЗК по сравнению с DR4.

Фиг. 7А-7Е являются гистограммами, на которых показано, что в активированных этанолом (EtOH) первичных человеческих ПЗК апрегулированы Acta2 (α -SMA, маркер активированных звездчатых клеток), фиброгенные маркеры и рецепторы TRAIL (DR5/DR4). На фиг. 7А-7Е показан кПЦР анализ ПЗК, активированных EtOH (30 и 50 мМ). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ в сравнении с неактивированными EtOH ПЗК.

Фиг. 8А и 8В являются гистограммами, на которых показаны отношения жизнеспособности клеток (%) при количественном определении с помощью МТТ-теста и активности каспазы 3/7 (эффектора апоптоза) после обработки TRAIL-ПЭГ (1 мкг/мл) активированных EtOH (50 мМ) ПЗК. Только активированные спиртом ПЗК чувствительны к TRAIL-индуцируемой гибели клеток. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ в сравнении с неактивированными EtOH ПЗК.

Фиг. 9 является линейным графиком, на котором количественно активность каспазы 3/7 (эффектора апоптоза) после обработки активированных EtOH (50 мМ) ПЗК различными концентрациями TRAIL-ПЭГ, конатумумаба (агонистического антитела против DR5) и мапатумумаба (агонистического антитела против DR4). Только TRAIL-ПЭГ и конатумумаб вызывают апоптоз в EtOH-активированных ПЗК.

На фиг. 10А-10Е показано влияние 48-часового инкубирования в культуре с кондиционированной средой (КС), полученной из активированных ПЗК в бессывороточных условиях (ПЗК-КС), на возбудимость сенсорных нейронов из ганглиев дорсальных корешков (ГДК) *in vitro*, как продемонстрировано с помощью фиксации потенциала целой клетки. Фиг. 10А является диаграммой репрезентативных отслеживаний, на которой показаны увеличенные спонтанные и индуцированные потенциалы действия в нейронах, культивируемых с ПЗК-КС. Это сопровождается значительным уменьшением реобазы (количества тока, требуемого для возбуждения потенциала действия) (см. фиг. 10В). На фиг. 10С показаны увеличенные вызванные потенциалы действия. На фиг. 10D показана увеличенная амплитуда потенциала действия. На фиг. 10Е показаны сниженные токи I_a (переходные токи K_v важны для поддержания возбудимости).

Фиг. 11 является гистограммой, на которой показано уменьшенное количество МРО+ (маркер нейтрофилов) клеток у получавших TRAIL-ПЭГ крыс с ОП. Лечение TRAIL-ПЭГ значительно уменьшило воспаление и количество инфильтрирующих МРО+ клеток в поджелудочной железе. * $P < 0,05$ в сравнении с Сег-PBS (необработанные крысы с ОП).

Фиг. 12 является диаграммой, на которой представлен временной график для схемы исследования для тестирования TRAIL-ПЭГ в модели хронического панкреатита (ХП) на крысах. Модель индуцированного спиртом ХП была получена на крысах Спрег-Дули (SD) при кормлении этанолом/жидкой диетой Либера-ДеКарли в течение 43 дней и пяти еженедельных инъекциях церулеина (20 мкг/кг). Этанол добавляли в диету от 0 до 36% общей калорийности в течение одной недели и поддерживали конечную концентрацию этанола, начиная в день 7, до конца исследования. Крысы получали церулеин (четыре почасовых в/б инъекции) в день 14, 21, 28, 35 и 41. TRAIL-ПЭГ (4 мг/кг, в/в) или PBS (контроль) вводили ежедневно в течение 7 дней, начиная в день 36.

Фиг. 13А и 13В являются гистограммами, на которых показана положительная область/поле в качестве количественного анализа цифровых изображений трихромного окрашивания по Массону (окрашивание коллагена) и окрашивания α -SMA (маркер активированных ПЗК) окраска.

Фиг. 14А-14І являются гистограммами, на которых показана экспрессия указанных генов относительно GAPDH у крыс с ХП, индуцированном церулеином и этанолом/диетой Либера-ДеКарли (EtOH-ХП), получавших PBS или TRAIL_{ПЭГ}. Показано влияние TRAIL_{ПЭГ} на различные фиброгенные маркеры. TRAIL_{ПЭГ} вызывает даунрегуляцию различных ассоциированных с фиброзом молекул на уровне мРНК (гена) у крыс с ХП, индуцированном церулеином и этанолом/диетой Либера-ДеКарли (EtOH-ХП). Уровни экспрессии генов ассоциированных с фиброзом маркеров, включающих: α -SMA, коллаген-1, коллаген-3, PDGFr, TIMP1, TIMP3, фибронектин, Пар и TGF β , были понижены после обработки TRAIL_{ПЭГ}- Acta2 - название мРНК альфа-SMA. TIMP - ингибитор ММП (ММП ответственны за расщепление коллагена). Фибронектин - маркер фиброза. ##P<0,01, ###P<0,001 в сравнении с парным кормлением (контроль), *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 в сравнении с EtOH-ХП/PBS.

Фиг. 15 является гистограммой, на которой показана концентрация гидроксипролина (мкг/г) (маркер коллагена) в тканях поджелудочной железы контрольных и ХП крыс (EtOH-ХП), получавших PBS или TRAIL_{ПЭГ}. TRAIL_{ПЭГ} значительно снижает уровни гидроксипролина в поджелудочной железе у крыс с ХП, индуцированном церулеином и этанолом/диетой Либера-ДеКарли (EtOH-ХП), по сравнению с необработанными EtOH-ХП. #P<0,05 в сравнении с контрольной группой, ***P<0,001 в сравнении с EtOH-ХП/PBS.

Фиг. 16 является линейным графиком, на котором показано количество ответов в зависимости от силы VFF у здоровых крыс и крыс с ХП (EtOH-ХП), получавших PBS или TRAIL_{ПЭГ}. TRAIL_{ПЭГ} уменьшает связанную с панкреатитом боль. Влияние TRAIL_{ПЭГ} на ноцицепцию оценивали в моделях хронического панкреатита (ХП) на крысах при измерении механической чувствительности живота по методу VFF (с использованием нитей фон Фрэя). TRAIL_{ПЭГ} показывает сильную антиноцицептивную эффективность в моделях ХП.

Подробное описание изобретения

I. Определения.

Под "уменьшением тяжести" подразумевают уменьшение, подавление, ослабление, снижение, прекращение или стабилизацию развития или прогрессирования заболевания.

Под "контролем" или "референсным" подразумевают стандарт сравнения. При использовании в настоящей заявке "измененный по сравнению с контролем" образец или субъект следует понимать как имеющие уровень, который статистически отличается от нормального, необработанного или контрольного образца. Контрольные образцы включают, например, клетки в культуре, одно или более лабораторных животных или одного или более пациентов. Способы отбора и анализа контрольных образцов известны специалистам. Анализом может быть природное вещество, которое обычно экспрессируется или вырабатывается клеткой или организмом (например, антитело, белок), или вещество, продуцируемое репортерной конструкцией (например, β -галактозидаза или люцифераза). В зависимости от способа, применяемого для обнаружения, количество и измерение изменения могут изменяться. Определение статистической значимости известно специалистам в данной области, например, значение стандартного отклонения от средних значений, которые составляют положительный результат.

"Обнаружение" относится к определению присутствия, отсутствия или количества аналита, который нужно обнаружить.

При использовании в настоящей заявке термин "диагностика" относится к классификации патологии или симптома, определению тяжести патологии (например, степени или стадии), мониторингу прогрессирования патологии, прогнозированию исхода патологии и/или определению перспектив восстановления.

Под терминами "эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" лекарственной формы или компонента лекарственной формы подразумевается количество лекарственной формы или компонента, отдельно или в комбинации, достаточное для получения требуемого действия. Например, под "эффективным количеством" подразумевается количество соединения, отдельно или в комбинации, требуемое для уменьшения тяжести одного или более симптомов заболевания или нарушения по сравнению с не проходившим лечение пациентом. Эффективное количество для терапевтического лечения заболевания изменяется в зависимости от способа введения, возраста, массы тела и общего состояния здоровья субъекта. В конечном счете, лечащий врач или ветеринар будут определять подходящее количество и схему применения.

Под "модуляцией" подразумевается изменение (увеличение или уменьшение). Такие изменения обнаруживают с помощью стандартных известных способов, таких как описанные в настоящей заявке.

"Фиброзное заболевание или нарушение" являются общим термином для прогрессирующего формирования избыточной фиброзной соединительной ткани в органе или ткани в репаративном или реактивном процессе. Фиброз может появиться во многих тканях тела, как правило, в результате воспаления или повреждения. Примеры органов или тканей, восприимчивых к фиброзу, включают, без ограничения перечисленными: легкие, поджелудочную железу, сердце, печень, кожу, пальцы, суставы, головной мозг, костный мозг, половой член и кишечник.

Термин "нормальное количество" относится к нормальному количеству комплекса у субъекта, у ко-

того, как известно, не было диагностировано заболевание или нарушение. Количество молекулы может быть измерено в исследуемом образце и сравнено с "нормальным контрольным уровнем" при использовании таких методов, как пределы референсных значений, пределы чувствительности или пороги определения риска для определения пороговых точек и отклоняющихся от нормы значений (например, при панкреатите). "Нормальный контрольный уровень" означает уровень одного или более белков (или нуклеиновых кислот) или показатели общего белка (или показатели общей нуклеиновой кислоты), как правило, обнаруженные у субъекта, который, как известно, не страдает раком предстательной железы. Такие нормальные контрольные уровни и пороговые точки могут изменяться в зависимости от того, используется ли молекула отдельно или в формуле, объединяющей другие белки в показатель. В альтернативе нормальный контрольный уровень может быть базой данных профилей белков субъектов, ранее проходивших исследования, у которых не развилось заболевание или нарушение в течение клинически соответствующего периода времени.

Уровень, который определен, может совпадать с контрольным уровнем или пороговым уровнем, или пороговым значением, или может быть повышен или понижен относительно контрольного уровня или порогового уровня, или порогового значения. В некоторых аспектах контрольным субъектом является подобранный контроль по одному виду, полу, этнической принадлежности, возрастной группе, статусу курения, индексу массы тела (ИМТ), текущему статусу терапевтической схемы, истории болезни или их комбинации, но отличается от проходящего диагностику субъекта тем, что контроль не страдает рассматриваемым заболеванием или не подвержен риску развития данного заболевания.

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель" является известной в данной области техники и включает фармацевтически приемлемый материал, композицию или растворитель, подходящие для введения соединений нуждающимся в этом пациентам.

Термин "агонист рецептора ФНО (фактор некроза опухоли)-родственного лиганда, вызывающего апоптоз (TRAIL)" при использовании в настоящей заявке относится к таким средствам, которые связываются и активируют рецепторы смерти (DR), TRAIL-R1 (DR4) и TRAIL-R2 (DR5). Агонисты рецептора TRAIL или TRA, включают, без ограничения перечисленными, рекомбинантный TRAIL, варианты рекомбинантного TRAIL, производные TRAIL и антитела против рецептора TRAIL, связывающиеся с TRAIL-R1 и/или TRAIL-R2, а также агонистические малые молекулы или молекулы пептидов, связывающиеся TRAIL-R1 и/или TRAIL-R2. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора TRAIL включают антитела к TRAIL-R2 (DR5).

В некоторых вариантах осуществления антитела к TRAIL включают, без ограничения перечисленным, антитела к DR5, первоначально разработанные для противоопухолевой терапии, конатумумаб, тигатузумаб, лексатумумаб, HGS-TR2/KMTR-2, LBY135, дрозитумаб, TAS266, DS-8273/DS-8273a, APG880, RG7386.

Термин "ПЭГилирование" относится к процессу ковалентного или нековалентного присоединения или объединения полимерных цепей полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулами и макроструктурами, таким как лекарственное средство, терапевтический белок или везикула.

Термины "предотвращать", "предотвращающий", "предотвращение" и "профилактическое лечение" относится к введению средства или композиции клинически бессимптомному субъекту, который подвергается риску развития, восприимчив или предрасположен к конкретному нежелательному состоянию, нарушению или заболеванию, и, таким образом, относится к предотвращению возникновения симптомов и/или их первопричины.

Фармацевтические композиции могут быть объединены в наборы или фармацевтические системы для применения в блокировании клеточного цикла в быстро делящихся клетках, например раковых клетках. Наборы или фармацевтические системы могут включать средство транспортировки, такое как коробку, картонную упаковку или пробирку, в которой компактно помещен один или более контейнерных средств, таких как флаконы, пробирки, ампулы, бутылки, шприцы или пакеты. Наборы или фармацевтические системы настоящего описания также могут включать прилагаемые инструкции по применению набора.

II. Композиции.

Полезные композиции включают агонисты рецептора смерти (рецептора TRAIL). Примеры агонистов рецептора смерти включают очищенный TRAIL, выделенный TRAIL, рекомбинантный TRAIL, варианты рекомбинантного TRAIL, производные TRAIL и антитела против рецептора TRAIL, связывающиеся с TRAIL-R1 и/или TRAIL-R2, а также агонистические малые молекулы или молекулы пептидов, связывающиеся TRAIL-R1 и/или TRAIL-R2. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора TRAIL включают антитела к TRAIL-R1 (DR4) и TRAIL-R2 (DR5).

A. Агонисты рецептора смерти.

Композиции предназначены для применения в способах лечения панкреатита и фиброзных заболеваний и нарушений поджелудочной железы с применением агонистов рецептора смерти TRAIL-R1 (DR4) и TRAIL-R2 (DR5), такие как ПЭГилированный аналог ФНО (фактор некроза опухоли)-родственного лиганда, вызывающего апоптоз (TRAIL), и агонистическое антитело против DR5, для уменьшения воспаления, фиброгенеза и боли, а также улучшения панкреатических функций в поджелудочной железе и

при панкреатите. Такое лекарственное средство на основе ПЭГилированного белка и антитела против DR5 обладают модифицирующим заболевание действием при панкреатите и фиброзе поджелудочной железы, а также в отношении боли. Они безопасны, обладают высокой стабильностью и активностью с увеличенным периодом полувыведения.

1) TRAIL.

ФНО (фактор некроза опухоли)-родственный лиганд, вызывающий апоптоз (TRAIL), представляет собой белок, функционирующий как лиганд, который вызывает процесс клеточной смерти, называемый апоптозом. TRAIL - цитокин, который синтезируется и секретируется большинством нормальных клеток ткани. Он вызывает апоптоз, прежде всего, в опухолевых клетках, связываясь с определенными рецепторами смерти. TRAIL также называют CD253 (кластер дифференцировки 253) и TNFSF10 (суперсемейство фактора некроза опухоли (лиганд), член 10).

У людей ген, который кодирует TRAIL, расположен на хромосоме 3q26, на удалении от других представителей семейства ФНО. Геномная структура гена TRAIL охватывает приблизительно 20 тпн и состоит из пяти экзонных сегментов размером 222, 138, 42, 106 и 1245 нуклеотидов и четырех интронов размером приблизительно 8,2, 3,2, 2,3 и 2,3 тпн. Ген TRAIL не имеет TATA и CAAT боксов, и промоторная область содержит предполагаемые элементы ответа для GATA, AP-1, C/EBP, SP-1, OCT-1, AP3, PEA3, CF-1 и ISRE.

TRAIL демонстрирует гомологию с другими членам суперсемейства фактора некроза опухоли. Он состоит из 281 аминокислоты и обладает свойствами трансмембранного белка II типа (т.е. не имеет лидерной последовательности и внутреннего трансмембранного домена). N-концевой эндоплазматический домен не консервативен с членами семейства, однако C-концевой внеклеточный домен консервативен и может протеолитически удаляться с клеточной поверхности. TRAIL образует гомотример, который связывает три молекулы рецептора.

TRAIL связывается с рецепторами смерти DR4 (TRAIL-R1) и DR5 (TRAIL-R2). Процесс апоптоза является каспаза-8-зависимым. Каспаза 8 активирует каскад эффекторных каспаз, включая прокаспазу-3, 6 и 7, что приводит к активации специфических киназ. TRAIL также связывает рецепторы DcR1 и DcR2, которые не содержат эндоплазматический домен (DcR1) или содержат усеченный домен смерти (DcR2). DcR1 функционирует как нейтрализующий TRAIL рецептор-приманка. Эндоплазматический домен DcR2 функционален и активирует NFκappaB. В клетках, экспрессирующих DcR2, связывание TRAIL вызывает активацию NFκappaB, что приводит к транскрипции генов, которые, как известно, выступают антагонистами сигнального пути клеточной смерти и/или вызывают воспаление. Как было показано, TRAIL взаимодействовал с TNFRSF10B.

TRAIL может быть получен в нативной или генетически сконструированной (рекомбинантной) форме. TRAIL может включать аминокислотный мотив-молнию, способствующий образованию тримера, и/или концевую группу, облегчающую его выделение и очистку.

Подходящие белки TRAIL включают TRAIL в человеческой форме, который имеет аминокислотную последовательность длиной 281 аминокислота, SEQ ID NO: 1:

MAMMEVQGGPSLQTCVLIVIFTVLLQSLCAVTVYVFTNELKMQMDKYSKSGIACFLK

EDDSYWDPNDEESMNSPCWQVKWQLRQLVRKMLILTSEETISTVQEKQONISPLVRERGPQRVA

AHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIEHKGFFYYIYSQ

TYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELK

ENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVG.

В предпочтительных вариантах осуществления TRAIL имеет аминокислотную последовательность от аргинина 114 (Arg, R) до глицина 281 (Gly, G) полноразмерной человеческой формы (1-281), и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2:

RERGPQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGE

LVIEHKGFFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEY

GLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVG.

Как правило, TRAIL модифицируют звеньями этиленгликоля (ЭГ), более предпочтительно 2 или больше звеньями ЭГ (т.е. полиэтиленгликоля (ПЭГ)) по N-концевому аминокислотному остатку. N-концевой аминокислотный остаток включает, без ограничения, лизин, цистеин, серин, тирозин, гистидин, фенилаланин или аргинин.

Как правило, любой аналог TRAIL может подходить для ПЭГилирования. Аналоги включают тримерный TRAIL, в котором по меньшей мере один из трех мономеров имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2, с одной или более аминокислотными заменами или делециями. Аналоги TRAIL могут быть получены *in vitro* при использовании стандартных методов молекулярной биологии.

TRAIL может быть присоединен к лейциновой или изолейциновой молнии (ILZ) на своем N-конце. В предпочтительных вариантах осуществления мотив молнии является изолейциновой молнией (Kim et al., BBRC, 321:930-935 (2004)).

2) Агонистические антитела к рецептору смерти.

В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела к рецептору смерти включают, без

ограничения перечисленными, антитела к DR5: конатумумаб, тигатузумаб, лексатумумаб, HGS-TR2J/KMTR-2, LBY135, дрозитумаб, TAS266, DS-8273/DS-8273a, APG880, RG7386, или химерные антитела, с одиночной, двойной или множественной антигенной или эпитопной специфичностями, а также фрагменты, такие как F(ab')₂ и т.п., включая гибридные фрагменты. Такие антитела и фрагменты могут быть получены способами, известными в уровне техники, и могут быть подвергнуты скринингу на специфичность и активность согласно общим методам получения антител и скрининга антител на специфичность и активность (см., например, Harlow and Lane. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988)).

Многие нечеловеческие антитела (например, полученные у мышей, крыс или кроликов) обычно являются антигенными у людей и, таким образом, могут приводить к нежелательным иммунным ответам при введении людям. Поэтому применением человеческих или гуманизированных антител в способах, описанных в настоящей заявке, служит для снижения вероятности того, что антитело, введенное человеку, вызовет нежелательный иммунный ответ. Гуманизированное или химерное агонистическое антитело к рецептору смерти может включать, по существу, все из по меньшей мере одного, и, как правило, двух, вариабельных доменов, в которых все или, по существу, все CDR-области соответствуют CDR-областям из нечеловеческого иммуноглобулина (т.е. донорского антитела), и все или, по существу, все каркасные области являются каркасными областями из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Предпочтительно агонистическое антитело к рецептору смерти также включает, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина. Константные домены агонистических антител к рецептору смерти могут быть выбраны в зависимости от предполагаемой функции антитела, в частности эффекторной функции, которая может потребоваться. В некоторых вариантах осуществления константные домены агонистических антител к рецептору смерти представляют собой (или включают) домены IgA, IgD, IgE, IgG или IgM человека.

Фрагменты антитела включают связывание и специфичность связывания антитела (и не требуют определенной биологической функции константных областей антитела), такие как связывающий фрагмент, специфичный к рецепторам смерти. Другие области антитела могут быть заменены любыми тяжелыми и легкими цепями или их частями и/или изменены на основе любых тяжелых и легких цепей или их частей, с ожиданием того, что будет сохранено биспецифичное связывание и специфичность связывания с целевым рецептором смерти. В случае фрагмента антитела и пептидных форм связывающий фрагмент, специфичный к рецептору смерти, может быть реализован в любой из многочисленных форм связывающих фрагментов и может быть связан любым подходящим способом, в том числе любым из мультивалентных и мультиспецифичных способов, применяемых для связывающих фрагментов антител. В случае раскрытых антител, фрагментов антител и полипептидов, такие формы будут биспецифичными вместо (или в дополнение к) мультивалентным. Примеры форм связывающих фрагментов включают F(ab')₂, антигенсвязывающий фрагмент (Fab), полуантитела, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), V_H домен, V-NAR домен, V_H домен, V_L домен, F(ab)₃, бис-scFv, диатело, триатело, тетратело и минитело. Любая из таких форм может независимо использоваться для реализации связывающего фрагмента, специфичного к рецептору смерти, и затем может быть комбинирована или соединена с применением любого подходящего линкера или сшивания. Связывающий фрагмент, специфичный к рецептору смерти, также может применяться в качестве части связывающего фрагмента мультивалентной и/или мультиспецифичной формы фрагментов антител. Примеры включают F(ab')₂, F(ab)₃, бис-scFv, диатело, триатело, тетратело и минитело.

3) Аналоги агонистов рецептора смерти.

Агонисты рецептора смерти могут быть модифицированы для включения дополнительной молекулы с получением, таким образом, аналогов. Молекула может быть полимерной молекулой, полипептидом, полисахаридом, радиоизотопной меткой и так далее. Молекула может быть нековалентно или ковалентно присоединена к агонистам рецептора смерти.

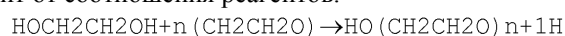
В некоторых вариантах осуществления молекулой является полиалкиленоксид, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Полиэтиленгликоль (ПЭГ) является полиэфирным соединением, применяемым во многих отраслях, от промышленного производства до медицины. Структура ПЭГ является следующей (следует обратить внимание на повторяющийся элемент в круглых скобках): H-(O-CH₂-CH₂)_n-OH. ПЭГ также известен как полиэтиленоксид (ПЭО) или полиоксиэтилен (ПОЭ), в зависимости от его молекулярной массы. ПЭГ, ПЭО или ПОЭ относятся к олигомеру или полимеру окиси этилена. Три названия химически синонимичны, но исторически ПЭГ предпочтителен в биомедицинской сфере, тогда как ПЭО более распространен в области химии полимеров. Поскольку различные применения требуют разной длины цепи полимера, ПЭГ обычно используется с молекулярной массой ниже 20000 г/моль, ПЭО относится к полимерам с молекулярной массой выше 20000 г/моль, и ПОЭ относится к полимеру любой молекулярной массы. ПЭГ и ПЭО представляют собой жидкости или низкоплавкие твердые вещества, в зависимости от их молекулярных масс. ПЭГ получают при полимеризации окиси этилена, при этом он доступен в продаже с широким диапазоном молекулярных масс, от 300 г/моль до 10000000 г/моль. Хотя ПЭГ и ПЭО с разной молекулярной массой находят применение в различных областях и имеют разные физические свойства (например, вязкость) из-за влияния длины цепи, их химические свойства почти

идентичны. Различные формы ПЭГ также доступны, в зависимости от инициатора, используемого для процесса полимеризации, при этом наиболее распространенным инициатором является монофункциональный метиловый эфир ПЭГ или метоксиполиэтиленгликоль, сокращенно мПЭГ. ПЭГ с более низкой молекулярной массой также доступны в виде более чистых олигомеров, называемыми монодисперсными, гомогенными или дискретными. ПЭГ очень высокой чистоты, как было недавно показано, является кристаллическим, что позволяет определять кристаллическую структуру с помощью рентгеновской дифракции. Поскольку очистка и разделение чистых олигомеров является сложной, стоимость при таком качестве часто в 10-1000 раз превышает стоимость полидисперсного ПЭГ.

ПЭГ также доступны с разной геометрической конфигурацией. Разветвленные ПЭГ имеют три - десять цепей ПЭГ, отходящих от центральной основной группы. Звездообразные ПЭГ имеют 10-100 цепей ПЭГ, отходящих от центральной основной группы. Гребнеобразные ПЭГ имеют множество цепей ПЭГ, обычно привитые на основную полимерную цепь. Числа, которые часто включают в названия ПЭГ, обозначают их средние молекулярные массы (например, ПЭГ с $n=9$ будет иметь среднюю молекулярную массу приблизительно 400 дальтон и будет обозначен ПЭГ400). Большинство ПЭГ включают молекулы с распределением молекулярных масс (т.е. они полидисперсные). Распределение по размерам может быть охарактеризовано статистически их средневесовой молекулярной массой (M_w) и их среднечисловой молекулярной массой (M_n), отношение которых называют индексом полидисперсности (M_w/M_n). M_w и M_n могут быть измерены с помощью масс-спектрометрии.

ПЭГилирование является процессом ковалентного присоединения структуры ПЭГ к другой более крупной молекуле, например, терапевтическому белку, который затем называют ПЭГилированным белком. ПЭГилированный интерферон альфа-2а или 2b обычно используют для инъекционного лечения гепатита С. ПЭГ растворяется в воде, метаноле, этаноле, ацетонитриле, бензоле и дихлорметане и нерастворим в диэтиловом эфире и гексане. Его сшивают с гидрофобными молекулами, получая неионогенные ПАВ. ПЭГ содержат потенциально токсичные примеси, такие как окись этилена и 1,4-диоксан. Этиленгликоль и его эфиры нефротоксичны при нанесении на поврежденную кожу.

Полиэтиленгликоль получают при взаимодействии окиси этилена с водой, этиленгликолем или олигомерами этиленгликоля. Реакцию катализируют кислотные или основные катализаторы. Этиленгликоль и его олигомеры предпочтительны в качестве исходного материала вместо воды, потому что они позволяют получать полимеры с низкой полидисперсностью (узким распределением молекулярной массы). Длина цепи полимера зависит от соотношения реагентов.



В зависимости от типа катализатора механизм полимеризации может быть катионным или анионным. Полимеризация окиси этилена является экзотермическим процессом.

ПЭГилирование (также часто в форме написания пэгилирование) является процессом ковалентного и нековалентного соединения или объединения полимерных цепей полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулами и макроструктурами, такими как лекарственное средство, терапевтический белок или везикула, которые затем называют ПЭГилированными (пэгилированными). ПЭГилирование обычно проводят путем инкубирования реакционноспособного производного ПЭГ с целевой молекулой. Ковалентное присоединение ПЭГ к лекарственному средству или терапевтическому белку может "маскировать" средство от иммунной системы хозяина (уменьшая иммуногенность и антигенность) и увеличивать гидродинамический размер (размер в растворе) средства, что увеличивает его время циркуляции, уменьшая почечный клиренс. ПЭГилирование также может обеспечивать растворимость гидрофобных лекарственных средств и белков в воде.

ПЭГилирование представляет собой процесс присоединения цепей полимера ПЭГ к молекулам, как правило, пептидам, белкам и фрагментам антител, которое может повысить безопасность и эффективность многих терапевтических средств. Это приводит к изменению физико-химических свойств, включая изменения структуры, электростатического связывания, гидрофобности и т.д. Такие физические и химические изменения увеличивают системное удерживание терапевтического средства. Кроме того, это может влиять на аффинность связывания терапевтической молекулы с клеточными рецепторами и может изменять профили абсорбции и распределения.

ПЭГ - наиболее привлекательный полимер для конъюгирования. Особыми свойствами молекул ПЭГ, подходящими для фармацевтического применения, являются: растворимость в воде, высокая подвижность в растворе, отсутствие токсичности и низкая иммуногенность, легкое выведение из организма и измененное распределение в теле.

Биологическая активность производного TRAIL может быть увеличена путем селективного ПЭГилирования. Действие лекарственных средств может быть также усилено посредством процесса ПЭГилирования. Применение ПЭГилирования увеличивает молекулярную массу, защиту участка метаболического расщепления и ингибирование участка иммуногенности с увеличением периода полувыведения и стабильности *in vivo* и уменьшением иммуногенности. Кроме того, почечная экскреция пептидов и белков, связанных с ПЭГ, уменьшается из-за увеличения молекулярных масс пептидов и белков при использовании ПЭГ, поэтому ПЭГилирование обладает преимуществами увеличения эффектов как в фармакокинетическом, так и в фармакодинамическом отношении.

Предпочтительно полиэтиленгликоль или его производное являются линейными или разветвленными, или могут находиться в форме димера или тримера, с или без линкера с TRAIL и/или другими молекулами ПЭГ. Репрезентативные производные полиэтиленгликоля включают метоксиполиэтиленгликоль сукцинимидилпропионат, метоксиполиэтиленгликоль N-гидроксисукцинимид, метоксиполиэтиленгликоль пропиональдегид, метоксиполиэтиленгликоль малеимид или различные разветвленные типы этих производных. Предпочтительно производным полиэтиленгликоля является линейный метоксиполиэтиленгликоль малеимид, метоксиполиэтиленгликоль малеимид разветвленного типа или тримерный метоксиполиэтиленгликоль малеимид, и более предпочтительно - тримерный метоксиполиэтиленгликоль малеимид.

После ПЭГилирования производного TRAIL полиэтиленгликолем или получения его производного, молекулярная структура аналога может быть подтверждена с помощью масс-спектрометрии, жидкостной хроматографии, анализом рентгеновской дифракции, поляриметрии и сравнения расчетных значений и измеренных значений репрезентативных элементов в составе ПЭГилированного TRAIL.

4) Вспомогательные вещества.

TRAIL, антитела или производные могут быть включены в лекарственную форму для введения. Как правило, для инъекции, ингаляции, пульмонального введения или внутриглазного введения применяют лиофилизированную форму или высушенный распылением порошок, который может быть растворен для введения в стерильной воде, буфере или другим вспомогательным веществом, таком как перечислено в справочнике Гудмана и Гилмана (Goodman and Gilman).

ПЭГилированное производное TRAIL с полиэтиленгликолем или его производным может быть получено в виде жидкости или суспензии, необязательно включающей буферные вещества, суспендирующие вещества, бактериостатические средства или модификаторы вязкости, а затем фасовано в ампулу или флакон в форме для разового введения. Композицию стерилизуют фильтрацией, облучением или газом, таким как окись этилена.

III. Способы получения композиций.

A. Способы получения TRAIL и ПЭГилированного TRAIL.

Первый этап ПЭГилирования - функционализация полимера ПЭГ по одному или обоим концам. ПЭГ, которые активированы на каждом конце одной и той же реакционноспособной группой, известны как "гомобифункциональные", тогда как в случае, если присутствующие функциональные группы отличаются, то производное ПЭГ называют "гетеробифункциональным" или "гетерофункциональным". Химически активные или активированные производные полимера ПЭГ получают для присоединения ПЭГ к требуемой молекуле.

Полные процессы ПЭГилирования для конъюгирования белков можно широко подразделить на два типа, а именно, периодический процесс в фазе раствора и периодический процесс с подпиткой на колонке. Простой и обычно применяемый периодический процесс включает смешивание реагентов в подходящем буферном растворе, предпочтительно при температуре 4-6°C с последующим разделением и очисткой требуемого продукта при использовании подходящей методики на основе их физико-химических свойств, включающей эксклюзионную хроматографию (SEC), ионообменную хроматографию (IEX), хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC) и мембраны или водные двухфазные системы.

Выбор подходящей функциональной группы для производного ПЭГ основан на типе доступной реакционноспособной группы на молекуле, которая будет соединена с ПЭГ. В случае белков типичные реакционноспособные аминокислоты включают лизин, цистеин, гистидин, аргинин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, серин, треонин и тирозин. N-концевая аминогруппа и C-концевая карбоксильная группа также могут использоваться в качестве сайтспецифического участка при конъюгировании с альдегид-функциональными полимерами. Методики, применяемые для получения производных ПЭГ первого поколения, обычно заключаются в реакции полимера ПЭГ с группой, которая способна взаимодействовать с гидроксильными группами, как правило, ангидридами, хлорангидридами, хлорформатами и карбонатами. В химии ПЭГилирования второго поколения для конъюгирования используют более эффективные функциональные группы, такие как альдегид, сложные эфиры, амиды и т.д.

Эти гетеробифункциональные ПЭГ очень удобны для соединения двух молекул, при этом необходим гидрофильный, гибкий и биосовместимый спейсер. Предпочтительными концевыми группами для гетеробифункциональных ПЭГ являются малеимид, винилсульфоны, пиридилдисульфид, амин, карбоксильные группы и сложные эфиры NHS. Доступны ПЭГилирующие агенты третьего поколения, где форма полимера разветвлена, имеет Y-образную форму или гребнеобразную форму, которые обладают пониженной вязкостью и не накапливаются в органах. Непредсказуемость периода выведения для ПЭГилированных соединений может приводить к накоплению высокомолекулярных соединений в печени, что приводит к образованию телец включения с неизвестными токсикологическими последствиями. Кроме того, изменение длины цепи может привести к неожиданным периодам выведения *in vivo*.

B. Способы получения агонистов рецептора смерти.

Антитела и фрагменты антител могут быть получены с помощью любого способа, известного в уровне техники, применяемого для производства полипептидов, например, синтеза *in vitro*, получения рекомбинантных ДНК и т.п. Антитела могут быть получены с помощью технологии рекомбинантных

ДНК. Агонистические антитела против DR5 могут быть получены при использовании технологии экспрессии рекомбинантного иммуноглобулина. Рекомбинантное получение молекул иммуноглобулина, в том числе гуманизированных антител, описано в патенте США 4,816,397 (Boss et al.), патентах США 6,331,415 и 4,816,567 (оба за авторством Cabilly et al.), патенте Великобритании GB 2,188,638 (Winter et al.) и патенте Великобритании GB 2,209,757. Методики рекомбинантной экспрессии иммуноглобулинов, в том числе гуманизированных иммуноглобулинов, также можно найти в Goeddel et al., *Gene Expression Technology Methods in Enzymology* Vol. 185 Academic Press (1991), и Borreback, *Antibody Engineering*, W. H. Freeman (1992). Дополнительную информацию по поводу создания, конструирования и экспрессии рекомбинантных антител можно найти в Mayforth, *Designing Antibodies*, Academic Press, San Diego (1993).

Антитела также могут быть получены при иммунизации животных синтетическим или очищенным мономерным, гомомерным или гетеромерным DR5. Иммунную сыворотку наносят на колонку для аффинной хроматографии пептидов с получением высокоспецифичного иммунореагента.

Человеческие антитела и гуманизированные антитела, описанные в настоящей заявке, могут быть получены любым известным методом. Примеры методов получения человеческих моноклональных антител включают описанные в Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1), 86-95 (1991). Человеческие антитела, описанные в настоящей заявке (и их фрагменты), также могут быть получены при использовании библиотек фагового дисплея (см., например, Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222, 581-597 (1991)). Человеческие антитела, описанные в настоящей заявке, также могут быть получены в трансгенных животных. Например, были описаны трансгенные мутантные мыши, которые способны к продукции полного репертуара человеческих антител в ответ на иммунизацию (см., например, Jakobovits et al., *PNAS*, 90, 2551-2555 (1993); и Jakobovits et al., *Nature*, 362, 255-258 (1993)).

Способы гуманизации нечеловеческих антител известны в уровне техники. Например, гуманизированные антитела могут быть получены путем замены определяющих комплементарность областей (CDR) или CDR последовательностей грызунов соответствующими последовательностями человеческого антитела. Подробные методики раскрыты в Jones et al., *Nature*, 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332, 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239, 1534-1536 (1988).

Способы, которые могут применяться для получения гуманизированных антител, также описаны в патенте США 4,816,567; патенте США 5,565,332; патенте США 5,721,367; патенте США 5,837,243; патенте США 5,939,598; патенте США 6,130,364; и патенте США 6,180,377.

IV. Способы применения.

Агонисты рецептора смерти могут применяться для лечения панкреатита, фиброза поджелудочной железы, боли в поджелудочной железе или их любой комбинации. Агонисты рецептора смерти могут применяться при снижении, остановке или регрессии панкреатического воспаления на ранних стадиях воспалительного процесса, при снижении, остановке или регрессии фиброза поджелудочной железы и снижении или остановке боли в поджелудочной железе.

Доза для человека фармацевтической композиции, содержащей производное TRAIL, ПЭГилированное полиэтиленгликолем или его производным, может изменяться в зависимости от возраста, массы тела, пола, формы введения, состояния здоровья и стадии заболевания у пациентов, и может быть введена по решению врачей или фармацевтов, при этом предпочтительно доза составляет 0,01-200 мг/кг/день.

Как описано в примерах, исследовали действие TRAIL_{ПЭГ} в первичных человеческих ПЗК. В частности, исследовали противфиброзную эффективность и противоболевую эффективность TRAIL_{ПЭГ} при внутривенном введении в различных моделях панкреатита на крысах, в том числе церулеин-индуцированного острого панкреатита (ОП) и индуцированного этанолом/церулеином/диетой Либер-ДеКарли (LD) хронического панкреатита (ХП). Как описано в настоящей заявке, сигнализация TRAIL играет важную роль в фиброгенезе поджелудочной железы, а также в регуляции TGFβ, что может напрямую сенсibilизировать ноцицепторы и вызывать гипералгезию поджелудочной железы. TRAIL_{ПЭГ} уменьшал прогрессирование панкреатита в острой и в хронической фазах. Неожиданно, лечение TRAIL_{ПЭГ} значительно уменьшало боль в моделях ХП на крысах.

Как подробно описано ниже, TRAIL_{ПЭГ} селективно блокирует активацию ПЗК и устраняет активированные ПЗК, эффекторы ХП, что приводит к регрессии ХП. Кроме того, направленно воздействуя на ПЗК, которые сенсibilизируют ноцицепторы в результате апрегуляции TGFβ, TRAIL_{ПЭГ} уменьшает ХП-ассоциированную сильную боль, не вызывая системной токсичности.

Роль сигнализации TRAIL в фиброгенезе поджелудочной железы и боли исследовали с целью определить возможность применения агониста рецептора смерти (например, TRAIL_{ПЭГ} и антител против DR5) для терапии панкреатита в амбулатории. Предложено новое направление применения сигнализации TRAIL в терапии панкреатита и новые схемы на основе TRAIL.

А. Состояния, подлежащие лечению.

Панкреатит представляет собой воспаление поджелудочной железы. Поджелудочная железа - крупный орган позади желудка, который вырабатывает пищеварительные ферменты. Существует два основных типа - острый панкреатит и хронический панкреатит. Признаки и симптомы панкреатита включают

боль в верхней области живота, тошноту и рвоту. Боль часто иррадирует в спину и обычно острая. Во время острого панкреатита может наблюдаться лихорадка, при этом симптомы, как правило, разрешаются в течение нескольких дней. При хроническом панкреатите может наблюдаться снижение веса, стеаторея и диарея. Осложнения могут включать инфекцию, кровотечение, сахарный диабет или проблемы с другими органами.

Наиболее распространенными причинами острого панкреатита являются желчные конкременты и злоупотребление алкоголем. Другие причины включают прямую травму, некоторые лекарственные препараты, инфекции, такие как эпидемический паротит, и, помимо прочего, опухоли. Хронический панкреатит может развиваться в результате острого панкреатита. Это обычно происходит вследствие многолетнего злоупотребления алкоголем. Другие причины включают высокий уровень жиров в крови, повышенный кальций в крови, некоторые лекарственные препараты и определенные наследственные заболевания, такие как, помимо прочего, муковисцидоз. Курение увеличивает риск острого и хронического панкреатита. Диагноз острого панкреатита основывается на трехкратном повышении амилазы или липазы в крови. При хроническом панкреатите эти анализы могут соответствовать норме. Диагностическая визуализация, такая как УЗИ и КТ-исследование, также может быть полезной.

1) Острый панкреатит.

Острый панкреатит обычно лечат с применением внутривенных инъекций, противоболевой терапии и иногда антибиотиков. Как правило, исключается пища или питье, а в желудок могут вводить трубку. Процедуру, известную как эндоскопическая ретроградная холангиопанкреатография (ЭРХПГ), могут проводить для открытия канала поджелудочной железы, если он заблокирован. У лиц, имеющих желчные конкременты, желчный пузырь часто также удаляют. При хроническом панкреатите, в дополнение к вышеуказанному, временное питание через назогастральный зонд может использоваться для обеспечения достаточного питания. Могут потребоваться долговременные изменения питания и замещение ферментов поджелудочной железы, при этом иногда проводят операцию по частичной резекции поджелудочной железы.

Острый панкреатит появляется у приблизительно 30 из 100000 человек в год. Новые случаи хронического панкреатита развиваются у приблизительно 8 из 100000 человек в год и в настоящее время затрагивают приблизительно 50 из 100000 человек в США. В мировом масштабе, в 2013 году панкреатит привел к 123000 смертельных случаев с 83000 смертельных случаев в 1990 году. Панкреатит более часто встречается у мужчин, чем у женщин. Часто хронический панкреатит начинается в возрасте 30-40 лет, при этом у детей встречается редко. Острый панкреатит впервые был описан при вскрытии в 1882 году, тогда как хронический панкреатит был впервые описан в 1946 году.

Наиболее распространенными симптомами панкреатита являются острая, жгучая боль в верхней области или левом верхнем квадранте живота, иррадирующая в спину, тошнота и рвота, которая усиливается при приеме пищи. При физикальной диагностике результаты варьируют в зависимости от тяжести и наличия внутреннего кровотечения. Артериальное давление может повышаться при боли или снижаться в результате обезвоживания или кровотечения. Часто повышена частота сердечных сокращений и дыхания. Живот обычно мягкий, но в меньшей степени, чем при боли. Как часто наблюдается при заболевании органов брюшной полости, кишечные шумы могут быть приглушенными вследствие рефлекторного паралича кишечника. Может присутствовать лихорадка или желтуха. Хронический панкреатит может приводить к диабету или раку поджелудочной железы. Потеря веса неустановленной этиологии может наблюдаться в результате недостаточности ферментов поджелудочной железы, что препятствует нормальному пищеварению.

В восьмидесяти процентах случаев панкреатит вызван алкоголем или желчными конкрементами (камнями). Желчные камни - единственная наиболее распространенная причина острого панкреатита. Алкоголь - единственная наиболее распространенная причина хронического панкреатита.

Некоторые лекарственные средства часто ассоциированы с панкреатитом, обычно кортикостероиды, такие как преднизолон, но также сюда входят средства для лечения ВИЧ-инфекции - диданозин и пентамидин, диуретические средства, противосудорожное средство вальпроевая кислота, химиотерапевтические средства L-аспарагиназа и азатиоприн, эстрогены в результате повышения триглицеридов в крови, а также гипогликемические средства, такие как метформин, вилдаглиптин и ситаглиптин. Лекарственные средства, используемые для лечения состояний, которые сами по себе связаны с повышением числа случаев панкреатита, также могут быть связаны с панкреатитом. Примеры включают статины при лечении дислипидемии и глиптины при лечении диабета. Согласно системе мониторинга MedWatch Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США и опубликованным отчетам, атипичные нейролептики, такие как клозапин, рисперидон и оланзапин, также могут вызывать панкреатит.

Другие частые причины включают травму, эпидемический паротит, аутоиммунное заболевание, высокий уровень кальция в крови, гипотермию и эндоскопическую ретроградную холангиопанкреатографию (ЭРХПГ). Разделенная поджелудочная железа является наиболее распространенной врожденной аномалией поджелудочной железы, которая может лежать в основе некоторых рецидивирующих случаев. Сахарный диабет 2-го типа связан с повышенным в 2,8 раз риском.

Менее распространенные причины включают рак поджелудочной железы, камни в протоках под-

желудочной железы, васкулит (воспаление мелких кровеносных сосудов в поджелудочной железе), инфекцию, вызванную вирусом Коксаки, и Порфирию, в особенности острую перемежающуюся порфирию и эритропоэтическую протопорфирию.

Существует наследственная форма, которая приводит к активации трипсиногена в поджелудочной железе, что приводит к самоперевариванию. Вовлеченные гены могут включать Трипсин 1, который кодирует трипсиноген, SPINK1, который кодирует ингибитор трипсина, или регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе.

Частые причины панкреатита включают алкоголь/этанол, желчные конкременты, стероиды, травматический аутоиммунный панкреатит, эпидемический паротит, гиперлипидемию, гипотермию, гиперпаратиреоз, скорпионизм, эндоскопическую ретроградную холангиопанкреатографию и лекарственные средства (как правило, азатиоприн и вальпроевую кислоту).

Ряд возбудителей инфекции были признаны как причины панкреатита, включающие: эпидемический паротит, вирус Коксаки, гепатит В, цитомегаловирус, вирус простого герпеса и вирус ветряной оспы.

Дифференциальный диагноз панкреатита включает, без ограничения перечисленным, холецистит, холедохолитиаз, перфорированную язву желудка, инфаркт кишечника, непроходимость тонкой кишки, гепатит и мезентериальную ишемию. Диагноз требует 2 из 3 следующих критериев: характерное острое возникновение боли в эпигастральной области или неясной боли в животе, которая может иррадиировать спину (см. Признаки и симптомы выше), уровни амилазы или липазы в сыворотке >3 раза верхнюю границу нормы и визуализационное исследование с характерными изменениями. Для диагностики могут использовать КТ, МРТ, ультразвуковое исследование органов брюшной полости или эндоскопическое ультразвуковое исследование. Амилаза и липаза являются 2 ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой. Повышение липазы обычно считают лучшим показателем панкреатита, поскольку она обладает большей специфичностью и имеет более длительный период полувыведения. В случае визуализации ультразвуковое исследование органов брюшной полости является удобным, простым, неинвазивным и недорогостоящим методом. Оно обеспечивает более высокую чувствительность и специфичность при панкреатите, вызванном желчными камнями, чем другие методы визуализации. Тем не менее, у 25-35% пациентов наблюдению поджелудочной железы препятствуют кишечные газы, что затрудняет оценку. Контрастное КТ-исследование обычно проводят более чем через 48 ч после начала боли для оценки некроза поджелудочной железы и избытка панкреатического сока, а также для прогнозирования тяжести заболевания. Более раннее КТ-исследование может быть ложно обнадеживающим. ЭРХПГ или эндоскопическое УЗИ также можно использовать при подозрении желчной этиологии панкреатита.

Лечение панкреатита является поддерживающим и зависит от тяжести. Морфин обычно подходит для контроля боли. Существует сообщение, что морфин может вызывать спазм сфинктера Одди, однако это противоречивые сведения. Нет никаких клинических исследований, позволяющих предположить, что морфин может усиливать или вызывать панкреатит или холецистит. Лечение, которое применяют при остром панкреатите, будет зависеть от того, относится ли диагноз к умеренной форме состояния, которая не вызывает осложнений, или к тяжелой форме, которая может вызывать серьезные осложнения. Лечение легкого острого панкреатита успешно проводят при поступлении в отделение стационара общего профиля. Обычно людям не разрешали принимать пищу до разрешения воспаления, однако более поздние данные свидетельствуют о том, что ранний прием пищи безопасен и улучшает результаты. Поскольку панкреатит может вызывать поражение легких и влиять на нормальную функцию легких, кислород иногда подают через дыхательные трубки, которые подводят через нос. Затем трубки можно удалять через несколько дней после того, как станет ясно, что состояние улучшается. При эпизоде острого панкреатита может возникать обезвоживание, поэтому жидкости вводят внутривенно. Боль, связанная с даже легкими или умеренными случаями острого панкреатита, может быть острой, а это означает, что может потребоваться наркотический анальгетик.

Тяжелый панкреатит связан с органной недостаточностью, некрозом, инфекционным некрозом, псевдокистой и абсцессом. При диагнозе тяжелого острого панкреатита людей необходимо госпитализировать в отделение для больных с высоким риском или отделение интенсивной терапии. Уровень жидкости в организме может значительно снизиться, поскольку он перенаправляет жидкости и питательные вещества в попытке восстановить поджелудочную железу. Снижение уровня жидкости может привести к уменьшению объема крови в теле, что известно как гиповолемический шок. Гиповолемический шок может представлять угрозу жизни, так как он может очень быстро лишить организм обогащенной кислородом крови, которая необходима для выживания. Чтобы избежать развития гиповолемического шока, жидкости вводят внутривенно. Кислород подают через трубки, подведенные в нос, при этом оборудование для искусственной вентиляции может применяться для поддержки дыхания. Зонды для искусственного питания могут применяться для обеспечения питательных веществ в сочетании с соответствующим обезболиванием.

Как и при легком остром панкреатите, необходимо лечить первопричины - желчные камни, прекратить прием лекарственных средств, прекратить употребление алкоголя и т.д. Если причиной являются желчные камни, то может быть рекомендована процедура ЭРХПГ или удаление желчного пузыря. Желч-

ный пузырь требуется удалять при первой госпитализации или в течение двух недель после развития панкреатита, чтобы ограничить риск рецидива панкреатита. Если причиной панкреатита является алкоголь, прекращение употребления алкоголя и лечение алкогольной зависимости могут вызвать регрессию панкреатита. Даже если первопричина не связана с употреблением алкоголя, врачи рекомендуют исключить его в течение по меньшей мере шести месяцев, так как это может привести к дальнейшему повреждению поджелудочной железы в течение процесса восстановления. Потребление пищи, в особенности жиров, обычно ограничивают, однако раннее энтеральное питание в течение 48 ч, как было показано, улучшает клинические результаты. Жидкости и электролиты восполняют внутривенно. Клиническое питание инициируют с помощью зондового питания, чтобы обойти часть пищеварительного тракта, наиболее подверженного воздействию секретируемых ферментов поджелудочной железы, если отсутствует улучшение в первые 72-96 ч лечения.

Ранние осложнения включают шок, инфекцию, синдром системного воспалительного ответа, низкий уровень кальция в крови, высокий уровень глюкозы в крови и обезвоживание. Потеря крови, обезвоживание и выход жидкости в брюшную полость (асцит) могут привести к почечной недостаточности. Респираторные осложнения часто бывают тяжелыми. Обычно в плевральной полости присутствует выпот. Поверхностное дыхание, вызванное болью, может привести к коллапсу легких. Ферменты поджелудочной железы могут поражать легкие, вызывая воспаление. Тяжелое воспаление может приводить к внутрибрюшной гипертензии и синдрому абдоминальной компрессии, что еще больше нарушает функцию почек и дыхательных путей и потенциально требует вмешательства на открытой брюшной полости для снятия давления.

Поздние осложнения включают рецидивирующий панкреатит и развитие панкреатических псевдокист - полостей, содержащих секрет поджелудочной железы, которые ограничены стенкой из рубцовой ткани. Они могут вызывать боль, могут быть инфицированы, могут разрываться и кровоточить, блокировать желчный проток и вызвать желтуху или перемещаться по брюшной полости. Острый некротизирующий панкреатит может привести к панкреатическому абсцессу, накоплению гноя, вызванному некрозом, расплавлению тканей и инфекции. Это происходит примерно в 3% случаев или почти в 60% случаев при наличии более двух псевдокист и газа в поджелудочной железе.

2) Хронический панкреатит.

Хронический панкреатит является длительным воспалением поджелудочной железы, которое вызывает изменение нормальной структуры и функции данного органа. Он может представлять собой эпизоды острого воспаления в ранее поврежденной поджелудочной железе или хроническое повреждение с постоянной болью или мальабсорбцией. Это патологический процесс, характеризующийся необратимым повреждением поджелудочной железы в отличие от обратимых изменений при остром панкреатите. Ежегодно число вновь регистрируемых случаев хронического панкреатита составляет от 5 до 12 на 100000 человек, общее число случаев составляет 50 на 100000 человек. Чаше ХП встречается у мужчин, чем у женщин.

Симптомы при хроническом панкреатите обычно проявляются в постоянной боли в животе или стеаторее, вызванной нарушением абсорбции жиров из пищи. Значимая потеря веса часто возникает вследствие мальабсорбции и может оставаться клинической проблемой при прогрессировании заболевания. Пациент также может жаловаться на боль при потреблении пищи, особенно в случаях, когда пища содержит высокий процент жиров и белков.

К числу причин хронического панкреатита относятся: алкоголь, аутоиммунные нарушения, внутрипротоковая обструкция, идиопатический панкреатит, опухоли, ишемия и кальцифицированные камни. Взаимосвязь между этиологическими факторами, генетической предрасположенностью и темпом прогрессирования заболевания требует дальнейшего уточнения, хотя последние исследования показывают, что курение может являться фактором высокого риска развития хронического панкреатита. При исследовании в небольшой группе пациентов хронический панкреатит был наследственным. Почти у всех пациентов с кистозным фиброзом развивается хронический панкреатит, как правило, с рождения. Мутации генов при кистозном фиброзе также были идентифицированы у больных хроническим панкреатитом, у которых при этом не было других проявлений кистозного фиброза. Обструкция протока поджелудочной железы вследствие доброкачественного или злокачественного процесса может приводить к хроническому панкреатиту.

Механизм хронического панкреатита, рассматриваемый с генетической точки зрения, указывает на раннее начало острой эпигастральной боли, начиная с детства. Это аутосомно-доминантное заболевание, заболевание хроническим панкреатитом идентифицировали в гене катионного трипсиногена PRSS1 с мутацией R122H. R122H является наиболее распространенной мутацией при наследственном хроническом панкреатите, с заменой аргинина на гистидин в аминокислотном положении 122 белка трипсиногена. Конечно, существуют и другие механизмы - алкоголь, недостаточное питание и курение - каждый из них оказывает свое собственное действие на поджелудочную железу.

Диагноз хронического панкреатита основан на исследовании структуры и функции поджелудочной железы. Сывороточная амилаза и липаза могут быть умеренно повышены при хроническом панкреатите, при этом амилаза и липаза почти всегда повышены при остром состоянии. Тест на стимуляцию секрети-

ном считается лучшим тестом для диагностики хронического панкреатита. Другими тестами, используемыми для определения хронического панкреатита, являются сывороточный трипсиноген, компьютерная томография, ультразвуковое исследование и биопсия. В случае, когда хронический панкреатит вызван генетическими факторами, могут быть обнаружены повышения СОЭ, IgG4, ревматоидного фактора, АНА и антител к гладкой мускулатуре.

Различными способами лечения хронического панкреатита являются медицинские меры, терапевтическая эндоскопия и хирургическое вмешательство. Лечение направлено, по возможности, на первопричину, а также на устранение боли и мальабсорбции. Инсулинозависимый сахарный диабет может возникать и требовать длительной терапии инсулином. Боль в животе может быть очень сильной и может потребовать высоких доз анальгетиков, иногда опиатов. Прекращение употребления алкоголя и изменения питания (диета с низким содержанием жиров) важны для лечения боли и замедления кальцификационного процесса. Антиоксиданты могут помогать, но неясно, является ли их действие значимым. Замещение панкреатических ферментов часто эффективно при лечении мальабсорбции и стеатореи, связанной с хроническим панкреатитом. Лечение ХП состоит из введения раствора панкреатических ферментов во время еды. У некоторых пациентов наблюдается уменьшение боли при замещении ферментов и, поскольку они относительно безопасны, заместительная терапия ферментами при хроническом панкреатите является приемлемым этапом лечения для большинства пациентов. Лечение может быть более успешным у пациентов без поражения крупных протоков и у пациентов с идиопатическим панкреатитом. Хирургическое вмешательство для лечения хронического панкреатита обычно подразделяется на две области - резекционные и дренажные процедуры. Причины выбора оперативного лечения включают присутствие псевдокисты, фистулы, асцита или фиксированную обструкцию.

3) Фиброз поджелудочной железы.

Фиброз представляет собой образование избыточной волокнистой соединительной ткани в органе или ткани при репаративном или реактивном процессе. Это может быть реактивное, доброкачественное или патологическое состояние. В ответ на травму это называется рубцеванием, а если фиброз возникает из одной клеточной линии, его называют фибромой. Физиологически фиброз приводит к наложению соединительной ткани, которая может нарушать структуру и функцию подлежащего органа или ткани. Фиброз можно использовать для описания патологического состояния избыточного наложения волокнистой ткани, а также процесса наложения соединительной ткани при заживлении.

Фиброз подобен процессу рубцевания, поскольку в обоих случаях присутствуют стимулированные клетки, накладывающие соединительную ткань, включающую коллаген и гликозаминогликаны. Иммунные клетки, называемые макрофагами, а также любая поврежденная ткань между поверхностями, называемыми интерстицием, выделяют TGFβ. Существует множество причин этого, в том числе воспаление окружающей ткани или генерализованное воспалительное состояние, с повышенным уровнем циркулирующих медиаторов. TGFβ стимулирует пролиферацию и активацию фибробластов, которые накладывают соединительную ткань. Фиброз может встречаться во многих тканях тела, как правило, в результате воспаления или повреждения, и примеры включают: поджелудочную железу (хронический панкреатит), печень (цирроз), легкие (фиброз легких, кистозный фиброз, идиопатический фиброз легких), сердце (фиброз предсердия, фиброз эндомиокарда, перенесенный инфаркт миокарда), головной мозг (глиальный рубец), артрофиброз (колени, плечо, другие суставы), болезнь Крона (кишечник), контрактуру Дюпюитрена (руки, пальцы), келоид (кожа), средостенный фиброз (мягкие ткани средостения), миелофиброз (костный мозг), болезнь Пейрони (половой член), нефрогенный системный фиброз (кожа), прогрессирующий массивный фиброз (легкие); осложнение пневмокониоза у работников угольной промышленности, ретроперитонеальный фиброз (мягкие ткани забрюшинного пространства), склеродермию/системный склероз (кожа, легкие) и некоторые формы адгезивного капсулита (плечо).

4) Способы лечения панкреатита или панкреатического болевого синдрома.

а. Направленное воздействие на ПЗК.

При патологическом исследовании ХП распознают по значительному фиброзу. Панкреатический фиброгенез в основном формируют панкреатические звездчатые клетки (ПЗК) (Erkan, M., et al., Gut, 2012. 61(2):172-178; Omary, M.B., et al., J Clin Invest, 2007. 117(1):50-59; Pinzani, M., Gut, 2006. 55(1):12-14). При повреждении или заболевании поджелудочной железы покоящиеся ПЗК (пПЗК) подвергаются активации и трансформируются в пролиферативные, фиброгенные и сократимые миофибробласты, которые способствуют отложению коллагена и приводят к фиброзной ткани. По своей природе активированные ПЗК (аПЗК) являются основной мишенью противифиброзных терапий, направленных на поджелудочную железу (Omary, MB, et al., J Clin Invest, 2007. 117(1):50-59, Apte, MV, et al., J Gastroenterol Hepatol, 2006. 21 Suppl 3:S97-S101). Таким образом, устранение аПЗК является логической стратегией предотвращения, остановки и/или регрессии фиброгенеза и его осложнений, боли. Введение молекулярно-направленного средства, которое может блокировать активацию пПЗК в аПЗК и вызывать селективную индукцию апоптоза аПЗК, но не пПЗК, будет обеспечивать надежное противифиброзное действие при ХП, поскольку удаляется эффектор фиброгенеза поджелудочной железы. Регрессия фиброза поджелудочной железы останавливает/инвертирует прогрессирование ХП, что вызывает, следовательно, уменьшение боли, свя-

занной с ХП, и улучшает функции поджелудочной железы (фиг. 1).

b. Направленное воздействие на ось ПЗК-TGF β с применением агонистов рецептора смерти для лечения боли.

Переход от острой к хронической боли является областью активного исследования (Reichling, D.B. and Levine, J.D., *Trends Neurosci*, 2009. 32(12):611-618). Воспаление ткани инициирует каскад событий, приводящих к периферической сенсibilизации, т.е. усилению чувствительности первичных афферентных нейронов (ноцицепторов), тела которых расположены в ганглиях дорсальных корешков (ГДК), а центральный синапс оканчивается нейронами второго порядка в спинном мозге. Впрочем, мало известно о движущих факторах на поздних стадиях воспаления, когда фиброз ткани становится заметным. Как описано в настоящей заявке, лечение нейронов ГДК TGF β вызывало изменения возбудимости и подавляло удельный потенциалзависимый калиевый ток (IA), который является характерным признаком ноцицептивной возбудимости при хроническом панкреатите (Zhu, Y., et al., *Mol Pain*, 2012 8:65). TGF β может сам по себе сенсibilизировать ноцицепторы, индуцировать гипералгезию поджелудочной железы и способствовать усиленной поведенческой реакции, которая сопровождает ХП. Как описано здесь, ПЗК апрегулируют TGF β в ходе процесса активации и влияют на возбудимость нейронов ГДК. Новые факты о роли TRAIL и TGF β в ноцицепции также имеют значение при других состояниях, характеризующихся воспалением и хронической болью действительно, было указано, что "Переход от острых к хроническим болевым состояниям может быть наиболее важной проблемой в исследованиях по улучшению клинического лечения изнуряющей боли" (Reichling, DB and Levine, JD, *Trends Neurosci*, 2009 32(12):611-618).

С. Субъекты, подлежащие лечению.

Как правило, субъекты, подлежащие лечению, включают субъектов, страдающих или подверженных риску развития панкреатита, фиброза поджелудочной железы и/или боли в поджелудочной железе.

В некоторых вариантах осуществления субъекты, подлежащие лечению, включают субъектов, страдающих или подверженных риску развития панкреатита, фиброза поджелудочной железы и/или боли в поджелудочной железе, которые также страдают другими хроническими или острыми состояниями, такими как диабет 2 типа, фиброз печени, цирроз печени, рак печени, фиброз легких, фиброз кожи, рак поджелудочной железы, метастазирующий рак, аутоиммунные состояния, включая диабет 1 типа и ревматоидный артрит.

В других вариантах осуществления субъекты, подлежащие лечению, включают субъектов, страдающих или подверженных риску развития панкреатита, фиброза поджелудочной железы и/или боли в поджелудочной железе, которые не страдают дополнительными хроническими или острыми состояниями, такими как диабет 2 типа, фиброз печени, цирроз печени, рак печени, фиброз легких, фиброз кожи, рак поджелудочной железы, метастазирующий рак, аутоиммунные состояния, включая диабет 1 типа и ревматоидный артрит.

D. Эффективные количества агонистов DR5.

Композиции вводят в дозе от 0,001 до 100 мг/кг, например 0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мг/кг. Например, композиции вводят в дозе от 0,2 до 20 мг/кг или в дозе от 0,001 до 20 мг/кг.

В некоторых аспектах ткани поджелудочной железы защищены, фиброзное формирование уменьшено, фиброгенез поджелудочной железы инвертирован, боль уменьшена, и здоровые ткани поджелудочной железы не повреждены. В одном аспекте лечение фиброзного заболевания или нарушения включает уменьшение боли. Боль у субъекта уменьшается на 1-100%, например, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 и 100%.

В одном аспекте лечение фиброзного заболевания или нарушения включает уменьшение фиброза поджелудочной железы. Фиброз поджелудочной железы у субъекта уменьшается на 1-100%, например, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 и 100%.

В одном аспекте лечение фиброзного заболевания или нарушения включает уменьшение панкреатита. Панкреатит уменьшается на 1-100%, например 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 и 100%.

1) Доза и схемы лечения для комбинированной терапии.

Способы лечения, как правило, включают лечение заболевания или его симптома или способ достижения требуемого физиологического изменения, включающие введение млекопитающему, в особенности человеку, эффективного количества проапоптотического средства для лечения панкреатита или его симптома, или получения физиологического изменения.

Эффективное количество агониста рецептора смерти может быть введено субъекту в виде однократной дозы один раз или много раз. Введение могут производить один раз в день, два раза в день, три раза в день, один раз в неделю, два раза в неделю, раз в две недели или один раз в месяц.

Эффективное количество агониста рецептора смерти может быть введено в виде стандартной лекарственной формы (например, в виде единицы дозирования) или субтерапевтических доз, которые вводят в течение конечного интервала времени. Такие стандартные дозы могут вводить ежедневно в течение конечного периода времени, например, в течение до 3, или до 5, или до 7, или до 10, или до 15, или до 20,

или до 25 дней.

В некоторых вариантах осуществления стандартную дозу вводят в качестве основной терапии. В других вариантах осуществления стандартную дозу вводят вместе со вторым средством в комбинированной терапии.

а. Комбинированная терапия.

В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора смерти присутствует в комбинации с дополнительным действующим веществом. Агонисты рецептора смерти и дополнительное действующее вещество могут вводить вместе, например, как часть той же композиции, или вводить отдельно и независимо, в одно и то же или в разное время (т.е. введение лиганда или агониста и второго действующего вещества разделены конечным периодом времени друг от друга). Поэтому термин "комбинация" или "комбинированный" используется для обозначения совместного, одновременного или последовательного введения лиганда или агониста и второго действующего вещества. Комбинации могут вводить совместно (например, в виде смеси), отдельно, но одновременно (например, через отдельные внутривенные катетеры тому же субъекту; одно средство вводят перорально, тогда как другое средство вводят путем инфузии или инъекции, и т.д.), или последовательно (например, сначала вводят одно средство, затем второе).

В некоторых вариантах осуществления введение агонистов рецептора смерти в комбинации со вторым действующим веществом обеспечивает более высокий результат, чем при отдельном или раздельном введении проапоптотического средства и второго действующего вещества (т.е. результат, получаемый при введении комбинации, превышает сумму результатов, получаемых при введении компонентов по отдельности). В некоторых вариантах осуществления эффективное количество одного или обоих средств, применяемых в комбинации, ниже, чем эффективное количество каждого средства при раздельном введении. В некоторых вариантах осуществления количество одного или обоих средств, при использовании в комбинированной терапии, является субтерапевтическим при использовании по отдельности.

Схема лечения с применением комбинированной терапии может включать одно или множество введений лиганда или агониста. Схема лечения с применением комбинированной терапии может включать одно или множество введений второго действующего вещества.

В некоторых вариантах осуществления проапоптотическое средство вводят перед первым введением второго действующего вещества. В других вариантах осуществления лиганд или агонист вводят после первого введения второго действующего вещества.

Лиганд или агонист могут быть введены за или через по меньшей мере 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 24 или 30 ч или дней до или после введения второго действующего вещества.

Схемы или курсы дозирования средств могут полностью или частично перекрываться или могут быть последовательными. Например, в некоторых вариантах осуществления все такое введение(я) проапоптотического средства производят до или после введения второго действующего вещества. В альтернативе введение одной или более доз проапоптотического средства могут чередоваться по времени с введением второго терапевтического средства для получения однородного или неоднородного курса лечения, в котором вводят одну или более доз проапоптотического средства, затем одну или более доз второго действующего вещества, с последующим введением одной или более доз агонистов рецепторов смерти; или вводят одну или более доз второго действующего вещества, с последующим введением одной или более доз проапоптотического средства, после чего вводят одну или более доз второго действующего вещества; и т.д., все в соответствии с любой схемой, выбранной или требуемой исследователем или медработником, проводящему терапию.

V. Наборы.

Также раскрыты медицинские наборы. Медицинские наборы могут включать, например, запас дозы проапоптотического средства, предпочтительно лиганда или агониста для агонистического рецептора TRAIL, одного или в комбинации со вторым терапевтическим средством. В случае присутствия в комбинации со вторым терапевтическим средством, действующие вещества могут поставляться отдельно (например, в лиофилизированной форме) или в фармацевтической композиции (например, в смеси). Действующие вещества могут присутствовать в стандартной лекарственной форме или в базовой форме, которую требуется развести перед введением. В некоторых вариантах осуществления набор включает запас фармацевтически приемлемого носителя. Набор также может включать устройства для введения действующих веществ или композиций, например, шприцы. Наборы могут включать напечатанные инструкции по введению соединения для применения, как описано выше.

Далее настоящее изобретение будет описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры. Содержание всех ссылок, патентов и опубликованных заявок на патент, цитируемых по всему тексту настоящей заявки, а также чертежи, включено в настоящую документ путем отсылки.

Примеры

Общие методы.

Для тестирования эффективности TRAIL_{ДЭГ} in vivo, биологические образцы исследовали следующим образом.

Биохимический анализ и уровни липидов печени:

уровни сывороточной амилазы, липидазы, АЛТ, АСТ, ЩФ, натрия, холестерина, триглицерида,

глюкозы, альбумина, белка и азота мочевины определяли при использовании анализатора IDEXX.

Гистологическое исследование и ИГХ:

фиксированные образцы поджелудочной железы окрашивали Г-Э, сириусом красным, α -SMA и контрастно окрашивали гематоксилином Майера. Иммуофлуоресцентное (ИФ) двойное окрашивание выполняли при использовании подходящих антител против α -SMA, активной каспазы-3, и ядра окрашивали DAPI. Анализ TUNEL с тканями поджелудочной железы также выполняли для определения повреждения ДНК при воздействии апоптотических сигнальных каскадов.

ПЦР в реальном времени:

уровни экспрессии генов измеряли с помощью ПЦР-ПВ (ABI7500) при использовании подходящих праймеров к DR5, α -SMA, Pdgf-r, Colla1, Colla2, Colla3, Tgf-b1, Tgf-br2, Tgf-br3, Bmp7, Timp1/3, Mmp2/3/7/9/13, а также Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, FLIP и cIAP.

Вестерн-блоттинг:

вестерн-блот анализы выполняли с белковыми экстрактами из гомогенатов поджелудочной железы на ключевые маркеры, включающие, без ограничения перечисленными: DR5, α -SMA, коллаген, Timp, TGF β , Mmps, каспазу-8/-9/-3, расщепленный PARP-1, Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, FLIP, FADD и t-Bid.

Волевое поведение при использовании VFF теста и электростимуляции:

после обработки TRAIL_{ПЭГ}, 4 крысы из каждой группы ХП, индуцированного EtOH/церулеином/диетой LD, использовали для тестов VFF и исследований с электростимуляцией.

Данные и статистический анализ:

от шести до десяти животных в группе для антифиброзной терапии и четыре животных в группе для противоболевой терапии требовались для наблюдения различия между средними значениями в группах лечения и контрольных группах с 5% уровнем значимости и 90% мощностью. Срезы ткани исследовали клинические лаборанты без предварительного ознакомления с образцом. Интенсивность и степень окрашивания оценивали в баллах на основе принятой оценочной системы от 0 до 4. Иммуногистохимические (ИГХ) изображения анализировали с помощью NIH Image J. Сравнения между контролем и ап/даунрегулируемыми рецепторами, биомаркерами и между группами с и без лечения TRAIL_{ПЭГ}, проводили при использовании двустороннего точного критерия Фишера, однофакторного дисперсионного анализа или критерия хи-квадрат, в зависимости от ситуации. Все наборы данных анализировали путем множественных сравнений в различных контрольных группах. Все исследования проводили при использовании программы Prism (GraphPad). P-значения меньше 0,05 считали статистически значимыми во всех анализах.

Пример 1. Действие TRAIL_{ПЭГ} на клетки поджелудочной железы.

ПЭГилирование является золотым стандартом для увеличения периода полувыведения ($t_{1/2}$) белковых лекарственных средств и крайне эффективной коммерческой стратегией (Harris et al., Nat Rev Drug Discov, 2(3):214-221 (2003)). Более десяти ПЭГилированных биопрепаратов одобрены FDA, при этом ПЭГилированные белки обычно считаются менее иммуногенными (Alconcel et al., Polymer Chemistry, 2(7):1442-1448 (2011)). Чрезвычайно малый $t_{1/2}$ TRAIL (меньше 5 минут у грызунов и 30 минут у людей) (Kelley et al., J Pharmacol Exp Ther, 299(1):31-38 (2001); Ashkenazi et al., J Clin Oncol, 26(21):3621-3630 (2008)) затрудняет исследование функций TRAIL и проверку эффективности лекарственных средств, в особенности in vivo. ПЭГилированный TRAIL получали путем стабилизации тримерного TRAIL, включающего аминокислотные мотивы изолейциновой молнии (iLZ) на конце каждого мономера, что способствует образованию тримера на N-конце, с молекулой ПЭГ 5 кДа (TRAIL_{ПЭГ}) (WO 2007/145457). TRAIL_{ПЭГ} значительно повышал стабильность и увеличивал периоды полувыведения из кровотока у крыс и обезьян по сравнению с рекомбинантным TRAIL, таким как дуланермин (Genentech) (Lemke, J., et al., Cell Death Differ, 2014. 21(9):1350-1364), который был исследован в клинических условиях и показал хороший профиль безопасности, но низкую эффективность.

Материалы и методы.

Для исследования потенциальной токсичности в отношении поджелудочной железы, TRAIL_{ПЭГ} тестировали в ацинарных клетках поджелудочной железы (AR42J, ATCC CRL-1492) (ATCC) и первичных человеческих островках (поджелудочной железы) (Celprogen, Torrance, CA). Клетки AR42J (ATCC) поддерживали в среде RPMI 1640 (Corning cellgro, Manassas, VA, USA) с добавкой 20% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS; Sigma, St Louis, MO), 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина (Life Technology). Человеческие панкреатические островки клеток лангерганса (#35002-04, Celprogen, Torrance, CA) поддерживали в полном внеклеточном матриксе для первичной культуры клеток человеческих островков лангерганса (#E35002-04, Celprogen) и среде с сывороткой (Celprogen #M35002-04). Клетки культивировали при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂. Коротко, 2×10^4 клеток культивировали в течение 24 ч в 96-луночной планшете, затем обрабатывали TRAIL_{ПЭГ} (0, 101, 102, 103 нг/мл) в течение 3 ч и исследовали жизнеспособность клеток в тесте МТТ на апоптоз. После инкубирования в каждую лунку добавляли раствор МТТ и инкубировали в течение 4 ч. Оптическую плотность при 430 нм определяли при использовании спектрофотометра для микропланшетов (Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, VT).

Результаты.

Как показано на фиг. 2, TRAIL_{ПЭГ} не показал токсичности в отношении ацинарных клеток (AR42J) и первичных человеческих островков.

Пример 2. Активированные в культуре панкреатические Звездчатые клетки становятся чувствительными к TRAIL-индуцированному апоптозу.

Результаты показывают, что при активации первичных человеческих ПЗК в культуре, ПЗК превращались в миофибробласт-подобные клетки и апрегулировали DR4 и DR5, а также другие фиброгенные маркеры, и становились очень чувствительными к TRAIL_{ПЭГ} в результате апрегуляции DR5/DR4.

Активированные первичные человеческие ПЗК (аПЗК), не покоящиеся ПЗК (пПЗК), апрегулируют DR и становятся чувствительными к TRAIL-опосредованному апоптозу.

Материалы и методы.

Исследовали TRAIL-индуцированный апоптоз в первичных человеческих ПЗК. Человеческие ПЗК (ScienceCell Research Lab) выращивали в среде SteCM (ScienceCell) с добавкой 2% FBS, 1% добавки для роста звездчатых клеток и 1% раствора пенициллина/стрептомицина согласно инструкциям производителя. 2×10^5 ПЗК культивировали в 6-луночных планшетах, покрытых поли-L-лизинном, и культивировали в течение 2 (покоящиеся) дней и 7 дней (активированные) и собирали для анализа. В отличие от других клеток, звездчатые клетки, включая звездчатые клетки печени (ЗКП) и панкреатические звездчатые клетки (ПЗК), могут быть активированы и дифференцированы в активированные звездчатые клетки с культурой последовательных поколений (например, при культивировании более 5 дней). Экспрессию DR5 и DR4, α -SMA, коллагена и TGF β , а также PDGFR и TGF β , анализировали с помощью Вестерн-блоттинга в покоящихся и активированных клетках. Активацию вызывает простое культивирование в течение 7 дней.

Результаты.

Активация вызывала морфологические изменения ПЗК и значительно повышала фиброгенные маркеры и, что важно, DR4 и DR5 (фиг. 3A-3F). При обработке клеток TRAIL_{ПЭГ} (1 мкг/мл) в течение 3 ч в покоящемся или активированном состоянии, TRAIL-индуцированный апоптоз четко наблюдали в аПЗК, но не в пПЗК, что подтверждалось особенностями апоптоза клеток и количественным определением апоптоза клеток, измеренным с помощью теста MTT (фиг. 4).

Мониторинг регуляции TRAIL-сигнальных молекул, маркеров фиброза и маркеров апоптоза.

Регуляцию TRAIL-сигнальных молекул, маркеров фиброза и маркеров апоптоза контролировали в первичных человеческих ПЗК во время активации. Безопасность подтверждали в первичных человеческих островках и ацинарных клетках поджелудочной железы.

Материалы и методы.

Репрезентативные TRAIL-сигнальные и связанные с фиброзом молекулы определяли при скрининге в уровнях белков и мРНК в первичных человеческих ПЗК (ScienceCell). ПЗК активировали в культуре в течение 2, 4 и 7 дней в среде SteCM и собирали. Экспрессию TRAIL-сигнальных молекул DR5, DR4 и FLIP и маркеров фиброза α -SMA, Pdgf-г, коллагена 1/2/3 типа, Mmps, Timps, коллагенов и TGF β , а также апоптотических и антиапоптотических маркеров, в том числе каспазы-8, -9, -3, расщепленного PARP-1, BCL-2, BCL-XL, FLIP и cIAP, анализировали с помощью кПЦР и Вестерн-блоттинга. Изменения морфологии ПЗК наблюдали с помощью микроскопического исследования. После подтверждения профилей экспрессии TRAIL-сигнальных молекул, исследовали эффект TRAIL-индуцированного апоптоза во время активации ПЗК. Для молекулярных исследований покоящиеся и активированные в культуре ПЗК (от 2 до 7 дней) обрабатывали TRAIL_{ПЭГ} при 1 мкг/мл. Активированные ПЗК обрабатывали с или без TRAIL_{ПЭГ} (1 мкг/мл) в течение 3 ч и анализировали с помощью кПЦР.

Результаты.

Активированные ПЗК апрегулировали множество антиапоптотических белков, таких как BCL-2, BCL-XL, X-IAP, однако клетки оставались чувствительными к TRAIL-индуцированному апоптозу, что подтверждалось апрегуляцией расщепленного (Cl) PARP-1, Cl Casp-8 и Cl Casp-3. В случае большинства первичных раковых клеток такие апрегулированные антиапоптотические белки мощно ингибируют TRAIL-индуцированный апоптоз, вызывая устойчивость к TRAIL. Также было показано, что активированные ПЗК трудно убить при инкубировании с обычными токсическими средствами, включающими противоопухолевые средства, такие как доксорубин (DOX, 100 нМ), цисплатин (CIS, 10 мкМ) или перекись водорода (H₂O₂, 10 мкМ). При инкубировании активированных ПЗК с TRAIL_{ПЭГ} (1 мкг/мл) в течение 3 ч и токсическими средствами в течение 48 ч, только TRAIL_{ПЭГ} индуцировал сильный апоптоз, поскольку TRAIL_{ПЭГ}-обработанные клетки апрегулировали Cl PARP-1, Cl Casp-8, Cl Casp-3 и Cl Casp-9.

Активированные в культуре первичные человеческие ПЗК апрегулируют множество антиапоптотических белков (BCL-XL, BCL-2, X-IAP), но остаются чувствительными к TRAIL-индуцированному апоптозу, что подтверждается апрегуляцией положительно, расщепленного (Cl) PARP-1, Cl Casp-8 (каспазы-8) и Cl Casp-3 (каспазы-3).

Пример 3. Антитело против DR5, но не антитело против DR4, вызывает селективный апоптоз в активированных панкреатических звездчатых клетках.

TRAIL вызывает апоптоз при связывании со своими когнатными рецепторами, DR4 и DR5. Для исследования, необходимы ли оба рецептора TRAIL, чтобы вызывать апоптоз в активированных ПЗК, активность каспазы 3/7 (маркеров апоптоза) измеряли путем обработки активированных ПЗК человеческим агонистическим антителом против DR4 (мапатумумабом) или агонистическим антителом против DR5 (конатумумабом). Для обработки специфичными антителами к DR4 или DR5, ПЗК активировали в культуре в течение 7 дней в 96-луночном планшете (Corning), добавляли последовательные концентрации (0, 101, 102, 103 нг/мл) мапатумумаба (человеческого антитела против DR4, Creative Biolabs) или конатумумаба (человеческого антитела против DR5, Creative Biolabs) с белком G (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA #21193) и инкубировали в течение 3 ч, после чего клетки тестировали на активность каспазы. Активность каспазы 3/7 измеряли при использовании набора для определения активности каспазы 3/7 (Promega) согласно методике производителя. Люминесценцию каждого образца измеряли на спектрофотометре для планшетов (Bio-Tek Instruments Inc) с параметрами времени задержки 1 мин и времени считывания 0,5 с/луночка (n=4).

Чтобы исследовать профили экспрессии DR4 и DR5 на клеточной мембране активированных ПЗК, человеческие первичные ПЗК активировали в культуре в течение 2 и 7 дней, клетки собирали, два раза промывали холодным PBS и инкубировали в течение 30 мин с ФЭ-антителом против человеческого CD261 (DR4) или ФЭ-антителом против CD262 (DR5) (eBioscience, San Diego, CA). Мышиный ФЭ-IgG1 К изотипический контроль (eBioscience) использовали в качестве изотипического контроля. Экспрессию рецепторов TRAIL на поверхности клеток исследовали с помощью проточной цитометрии (Accuri C6, BD Biosciences, San Jose, CA). Гистографические результаты и данные средней интенсивности флуоресценции (MFI) анализировали при использовании программы FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR).

Результаты.

Как показано на фиг. 5, при обработке активированных ПЗК конатумумабом (антителом к DR5, 103 нг/мл), активность каспазы-3/7 была повышена в $10,79 \pm 1,42$ раз. Напротив, мапатумумаб (103 нг/мл) не повышал активность каспазы-3/7 ($1,27 \pm 0,03$ раз). Затем, экспрессию DR4 и DR5 на клеточной мембране ПЗК исследовали с помощью анализа методом проточной цитометрии при использовании DR4 или DR5-специфичных антител, меченных фикоэритрином (ФЭ) в покоящихся (день 2) и активированных ПЗК (День 7). Неожиданно, большое изменение средней интенсивности флуоресценции (MFI) наблюдали только в активированных ПЗК, обработанных антителом к DR5, по сравнению с антителом к DR4 (фиг. 6А и 6В). Этот результат показал, что DR5 преимущественно экспрессировался на клеточной поверхности активированных ПЗК. В целом было показано, что вызванный TRAIL апоптоз в активированных ПЗК преимущественно опосредован DR5, а не DR4.

Пример 4. Активированные спиртом звездчатые клетки поджелудочной железы становятся чувствительными к апоптозу, индуцированному TRAIL и антителом против DR5.

Основной причиной хронического панкреатита (приблизительно в 70% всех случаев) является злоупотребление алкоголем. Показано, что покоящиеся ПЗК при активации спиртом, этанолом (EtOH), значительно повышают TRAIL-рецепторы DR4 и DR5 и становятся чувствительными к TRAIL-индуцированному апоптозу.

Материалы и методы.

Для исследования влияния спирта на активацию ПЗК, 2×10^5 человеческих первичных ПЗК культивировали в 6-луночных планшетах, покрытых поли-L-лизинном, в течение 24 ч и обрабатывали этанолом (EtOH) (0, 30, 50 mM) в течение 48 ч. После стимуляции спиртом клетки собирали для анализа с помощью кПЦР в реальном времени и Вестерн-блоттинга. Исследовали экспрессию TRAIL сигнальных молекул, включающих DR4, DR5, и фиброгенных факторов, включающих α -SMA (Acta2), коллагены. Для исследования TRAIL-индуцированного апоптоза в активированных спиртом ПЗК, 2×10^4 клеток культивировали в течение ночи в 96-луночном планшете и затем активировали 50 mM EtOH в течение 48 ч. Активированные EtOH ПЗК обрабатывали различными концентрациями (0, 101, 102, 103 нг/мл) TRAIL, TRAIL_{ПЭГ}, мапатумумаба (человеческого антитела против DR4) или конатумумаба (человеческого антитела против DR5) и инкубировали в течение 3 ч. Апоптоз измеряли с помощью MTT-теста апоптоза и анализа каспазы 3/7, как описано выше.

Результаты.

Как показано на фиг. 7А-7Е, покоящиеся ПЗК, обработанные EtOH (50 mM) в течение 48 ч, длительно апрегулировали уровни МРНК α -SMA (Acta2, $3,75 \pm 0,29$ раз), коллагена, (Col1 α 2, $4, \pm 0,43$ раз), рецептора PDGF (Pdgf-r, $1,9 \pm 0,25$ раз), а также рецепторов TRAIL (DR4; $2,1 \pm 0,12$, DR5 $1,8 \pm 0,09$ раз) по сравнению с неактивированными ПЗК. Кроме того, ПЗК, активированные EtOH (50 mM), продемонстрировали значимо увеличенный апоптоз против TRAIL_{ПЭГ} ($59,95 \pm 6,37\%$ апоптоза) и активность каспазы 3/7 (маркер апоптоза, $10,45 \pm 1,60$ раз) по сравнению с неактивированными ПЗК (фиг. 8А и 8В).

При обработке активированных спиртом ПЗК различными концентрациями TRAIL_{ПЭГ}/конатумумаба (агонистического антитела против DR5) и мапатумумаба (агонистического антитела против DR4), когда спирт все еще присутствовал в культуре, только TRAIL_{ПЭГ} и конатумумаб вызывали сильный дозозависимый апоптоз (фиг. 9). Как описано в примере 3, мапатумумаб, антитело против DR4, не вызывало

токсичности в активированных спиртом ПЗК. Исследования демонстрируют, что только агонистические антитела против DR5 вызывают апоптоз в активированных звездчатых клетках поджелудочной железы. Человеческий TRAIL и TRAIL_{ПЭГ} связываются с DR4 и с DR5, но антитела связывают только с DR4 или только с DR5. Эти результаты подтверждают, что человеческие аналоги TRAIL и агонистические антитела против DR5 могут применяться для лечения фиброза поджелудочной железы, боли и панкреатита путем направленного воздействия на апрегулируемый DR5 в поджелудочной железе.

Пример 5. Антиноцицептивная роль сигнализации TRAIL по оси ПЗК-ноцицептор-TGFβ.

Показано, что активированные ПЗК апрегулируют TGFβ (фиг. 3B). Поэтому активированные ПЗК могут быть основным клеточным источником TGFβ и могут играть роль в ноцицептивной сенситизации при боли.

Материалы и методы.

Воздействие активированных ПЗК на возбудимость сенсорных нейронов из ГДК (ганглиев дорсальных корешков) исследовали *in vitro* при инкубировании выделенных ГДК крысы с кондиционированной средой, полученной из активированных в культуре ПЗК (7 дней) в бессывороточной кондиционированной среде (ПЗК-КС). Возбудимость определяли с помощью электрофизиологической фиксации потенциала целых клеток с помощью усилителя Axopatch 200B и переводили данные в цифровую форму с помощью Digidata 1200.

Результаты.

Как продемонстрировано на фиг. 10A-10E, ПЗК-КС вызывала значимый и сопоставимый ответ от ГДК, что указывает на то, что активация ПЗК играет решающую роль в сенситизации ноцицепторов. Лечение TRAIL_{ПЭГ} вызывало регрессию боли, как было продемонстрировано в моделях хронического панкреатита (фиг. 16, пример 6). Таким образом, активированные ПЗК сенситизировали ноцицепторы посредством продукции TGFβ и стимуляции гипералгезии, которую блокировал TRAIL_{ПЭГ}.

Пример 6. Применение TRAIL_{ПЭГ} для противofiброзной и противоболевой терапии при ХП.

Для подтверждения того, что рецепторы смерти являются значимой мишенью противofiброзной и противоболевой терапии и диагностики, исследовали эффективность TRAIL_{ПЭГ} в качестве мощного противofiброзного, противоболевого лекарственного средства. TRAIL_{ПЭГ} показал сильную противofiброзную эффективность как при остром (фиг. 11), так и при хроническом панкреатите (фиг. 13A-15). Его противоболевая эффективность была продемонстрирована в модели ХП на крысах (фиг. 16). Исследование демонстрирует, что при системном введении TRAIL_{ПЭГ} уменьшает тяжесть как острого панкреатита (ОП), так и хронического панкреатита (ХП) в моделях на животных и вызывает снижение соматической отраженной гипералгезии в моделях ХП.

Материалы и методы.

Острый панкреатит (ОП) индуцировали почасовыми внутрибрюшинными инъекциями 20 мкг/кг церулеина у крыс (220-240 г) четыре раза, которых обрабатывали PBS или TRAIL_{ПЭГ} (в/в, 4 мг/кг, однократная инъекция) через 2 ч после последней инъекции церулеина. Две контрольные группы получали PBS или TRAIL_{ПЭГ} без церулеина. Крыс с ОП умерщвляли через 24 ч после введения TRAIL_{ПЭГ}.

Модель экспериментального, индуцированного спиртом хронического панкреатита (ХП) получали на крысах (Bertola, A., et al., Nat Protoc, 2013. 8(3):627-637; Deng, X., et al., Am J Pathol, 2005. 166(1):93-106). Как показано на фиг. 12, четыре группы крыс (n=8, каждая группа) получали жидкую диету Либера-ДеКарли (LD) с постепенным повышением концентрации EtOH с 0 до 36% в течение семи дней, и затем 36% EtOH в течение максимум шести недель. Крыс обрабатывали церулеином (четыре почасовых в/б инъекций) в день 14, 21, 28, 35 и 41. TRAIL_{ПЭГ} (4 мг/кг, в/в) или PBS (контроль) вводили ежедневно в течение 7 дней, начиная в день 36. Две контрольные группы без спирта в диете получали внутривенно PBS или TRAIL_{ПЭГ}.

Метод с применением нитей фон Фрея (VFF) является важным инструментом для исследования механизмов боли у грызунов (Zhu et al., Mol Pain, 8:65(2012)). После обработки в день 43, тест VFF использовали для изучения ноцицепции. После теста VFF животных умерщвляли, забирали образцы поджелудочной железы и исследовали с помощью ИГХ, кПЦР и Вестерн-блоттинга. Уровни гидроксипролина (маркер коллагена) в тканях поджелудочной железы определяли с помощью набора для анализа гидроксипролина (Sigma).

Результаты.

фотоизображения тканей поджелудочной железы, окрашенных Г-Э и иммуноокрашенных на инфилтрирующие нейтрофилы (MPO), продемонстрировали противовоспалительную эффективность TRAIL_{ПЭГ} (CER-TRAIL) при сравнении с группами ОП, получавшими PBS (Cer-PBS). Внутривенный TRAIL_{ПЭГ} (CER-TRAIL) защищает от острого панкреатита (ОП) у крыс с ОП, индуцированным церулеином (Cer-PBS). Количественный анализ результатов показан на фиг. 11.

В моделях ХП фиброгенез поджелудочной железы был продемонстрирован высокой экспрессией коллагена и α-SMA (маркера активированных ПЗК) (фиг. 13A и 13B), а также различных фиброгенных маркеров (фиг. 14A-14I). Лечение TRAIL_{ПЭГ} значимо снижало накопление коллагена, вызывало даунрегуляцию α-SMA и PDGFRβ, а также других фиброгенных маркеров и маркеров панкреатита, включаю-

щих коллагены (Col1a2, Col3a1), TIMPs (тканевой ингибитор металлопротеиназ), фибронектин, Пар (панкреатит-ассоциированный белок) и TGF β (фиг. 14A-14I). Уровни гидроксипролина в моделях ХП были сильно повышены. Лечение TRAIL_{ПЭГ} значимо снижало содержание гидроксипролина в поджелудочной железе (фиг. 15). Расщепленная каспаза-8 была значительно апрегулирована только в TRAIL_{ПЭГ}-обработанном ХП, что указывает на то, что устранение активированных ПЗК может быть вызвано TRAIL-опосредованным апоптозом. Важно то, что в результате двойного иммуноокрашивания тканей поджелудочной железы (аПЗК - окрашивание α -SMA, апоптоз - окрашивание TUNEL и ядро - окрашивание DAPI) можно было подтвердить, что апоптоз (окрашивание TUNEL) наблюдался специфично в α -SMA+ аПЗК. Системное введение только одного TRAIL_{ПЭГ} нормальным крысам не вызывало значимой токсичности. Например, обработка TRAIL_{ПЭГ} значимо нормализовала уровни АЛТ, удобного маркера повреждения печени, по сравнению уровнями АЛТ у необработанных крыс с ХП.

ХП сопровождается тяжелой и постоянной болью в животе. Неожиданно, TRAIL_{ПЭГ} показал антиноцицептивную эффективность в моделях ХП. TRAIL_{ПЭГ} уменьшал соматическую отраженную гипералгезию у крыс с ХП, индуцированной этанолом/церулеином/диетой LD. Обработанные TRAIL_{ПЭГ} (4 мг/кг, в/в) животные (n=4) продемонстрировали значимое снижение соматической отраженной гипералгезии при измерении в тесте VFF (фиг. 16). Было показано, что лечение нейронов ГДК с применением NGF (фактора роста нервов) или TGF β вызывало изменения их возбудимости и подавляло удельный потенциалзависимый калиевый ток (IA), который является признаком ноцицептивной возбудимости при ХП (Zhu et al., Mol Pain, 8:65(2012)). TGF β может сам по себе сенсibilизировать ноцицепторы, вызывать гипералгезию поджелудочной железы. В предварительных исследованиях было подтверждено, что ПЗК апрегулируют TGF β в процессе активации, при этом кондиционированные среды (КС), полученные из аПЗК, влияют на возбудимость нейронов ГДК. Активированные ПЗК апрегулируют TGF β (фиг. 3B), и кондиционированные среды (СМ), полученные из аПЗК, влияют на возбудимость нейронов ГДК (фиг. 10). Таким образом, активированные ПЗК являются преобладающим типом клеток, которые должны отвечать за ноцицептивную сенсibilизацию в поджелудочной железе, при этом активация ПЗК играет важную роль в сенсibilизации ноцицепторов. Поэтому данная методика представляет новый способ уменьшения боли путем селективного блокирования активации ПЗК или истощения активированных ПЗК, одного из доминантных клеточных источников TGF β и NGF (фактора роста нервов), с применением агонистов рецептора смерти.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения острого панкреатита или острого панкреатического болевого синдрома, включающий введение субъекту, страдающему острым панкреатитом или острым панкреатическим болевым синдромом, путем внутривенной или подкожной инъекции, интраназально, пульмонально или интраокулярно композиции, включающей агонист рецептора смерти в эффективной дозе 0,01-100 мг/кг, где агонист рецептора смерти представляет собой агонист, выбранный из группы, состоящей из апоптоз-индуцирующего лиганда семейства ФНО (TRAIL), агонистов рецептора смерти 5 (DR5), ПЭГилированного TRAIL, агонистических антител против рецептора смерти (DR5) и их комбинации.

2. Способ по п.1, где агонист рецептора смерти представляет собой агонист DR5, выбранный из группы, состоящей из лексатумумаба, тигатумумаба, конатумумаба, дрозитумаба, HGSTR2J/KMTR-2 и LBY-135.

3. Способ по п.1, где агонист рецептора смерти представляет собой мультивалентный агонист DR, выбранный из группы, состоящей из TAS266 и scTRAIL-RBDs.

4. Способ по п.1, где антитела являются полноразмерными антителами, их функциональными фрагментами, сохраняющими функциональность связывания, гуманизированными антителами, бифункциональными или химерными антителами или их комбинациями.

5. Способ по п.1, где агонистом является TRAIL или TRAIL, модифицированный полиалкиленоксидом.

6. Способ по п.5, где полиалкиленоксид является линейным, разветвленным, димером или тримером полиэтиленгликоля, имеющим молекулярную массу 5000-50000 дальтон.

7. Способ по любому из пп.1-6, где острый панкреатит или острый панкреатический болевой синдром выбран из группы, состоящей из острого панкреатита и острой боли, ассоциированной с фиброзом поджелудочной железы.

8. Способ по п.7, где острая боль, ассоциированная с фиброзом поджелудочной железы, является панкреатит-ассоциированной острой болью.

9. Способ по любому из пп.1-8, где способ дополнительно включает идентификацию пациента, страдающего или подверженного риску развития фиброз-ассоциированной острой боли.

10. Способ по любому из пп.1-9, где лечение острого панкреатита или острого панкреатического болевого синдрома обеспечивает защиту тканей поджелудочной железы, уменьшение фиброзного образования, инвертирование фиброгенеза поджелудочной железы и/или уменьшение боли, и сохранение здоровых тканей поджелудочной железы неповрежденными.

11. Способ по любому из пп.1-10, где лечение острого панкреатита или острого панкреатического болевого синдрома включает уменьшение боли.

12. Способ по любому из пп.1-10, где лечение острого панкреатита или острого панкреатического болевого синдрома включает уменьшение фиброза поджелудочной железы.

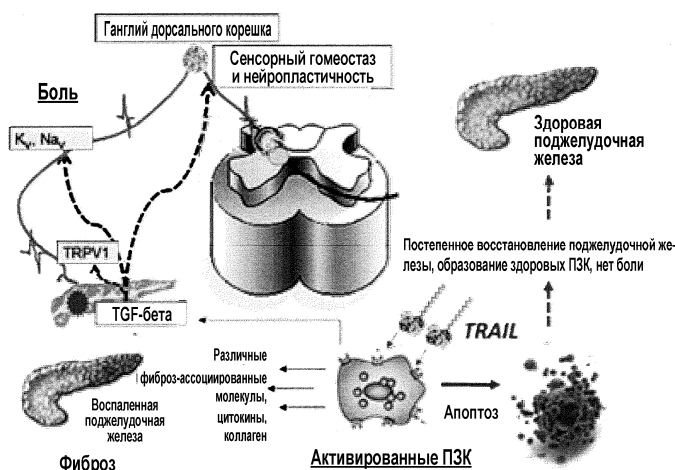
13. Способ по любому из пп.1-10, где лечение острого панкреатита или острого панкреатического болевого синдрома включает уменьшение воспаления поджелудочной железы.

14. Способ по любому из пп.1-13, где эффективное количество композиции вводят один раз в день, два раза в день, три раза в день, один раз в неделю, два раза в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц нуждающемуся в этом субъекту.

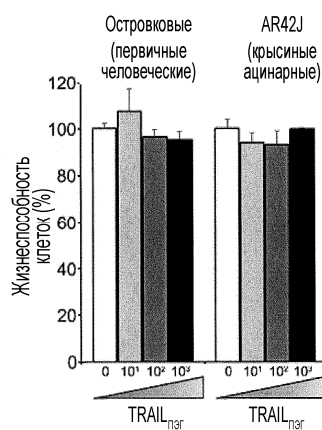
15. Применение фармацевтической композиции, включающей эффективное количество агониста рецептора смерти, где агонист рецептора смерти представляет собой агонист, выбранный из группы, состоящей из апоптоз-индуцирующего лиганда семейства ФНО (TRAIL), агонистов рецептора смерти 5 (DR5), ПЭГилированного TRAIL, агонистических антител против рецептора смерти (DR5) и их комбинации, для лечения острого панкреатита или острого панкреатического болевого синдрома.

16. Применение по п.15, где композиция дополнительно включает второе терапевтическое или профилактическое средство.

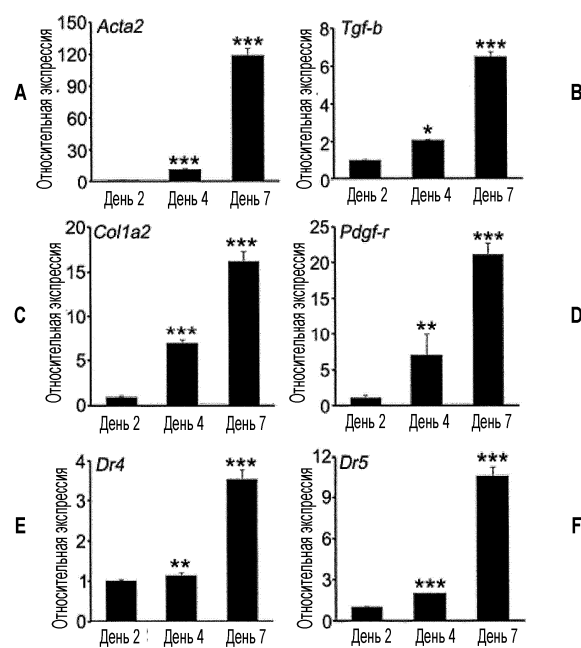
17. Применение набора, включающего лекарственную форму, содержащую в своем составе агонист рецептора смерти, один или в комбинации со вторым терапевтическим средством, где агонист рецептора смерти представляет собой агонист, выбранный из группы, состоящей из апоптоз-индуцирующего лиганда семейства ФНО (TRAIL), агонистов рецептора смерти 5 (DR5), ПЭГилированного TRAIL, агонистических антител против рецептора смерти (DR5) и их комбинации, для лечения острого панкреатита или острого панкреатического болевого синдрома.



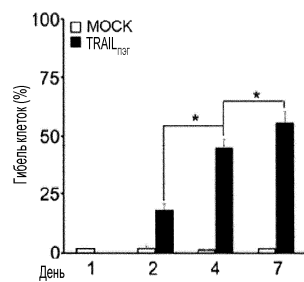
Фиг. 1



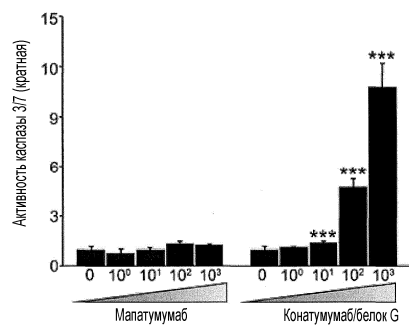
Фиг. 2



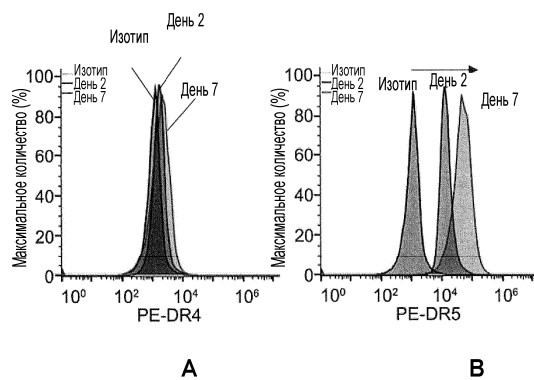
Фиг. 3



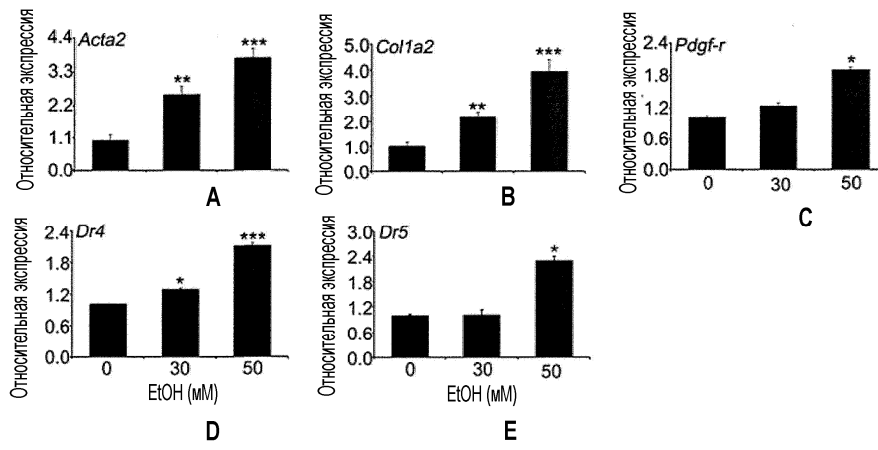
Фиг. 4



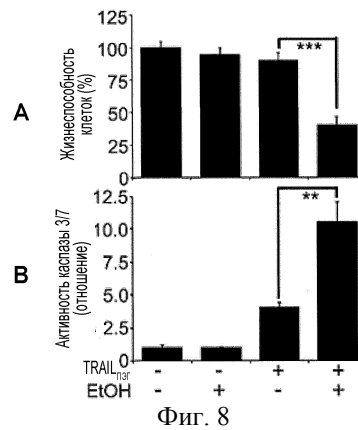
Фиг. 5



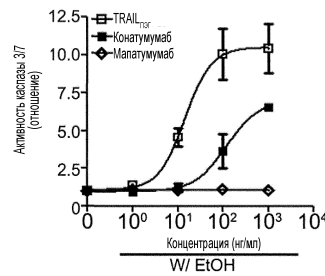
Фиг. 6



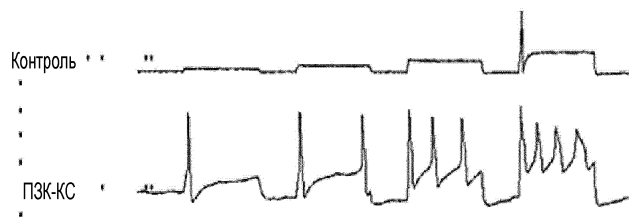
Фиг. 7



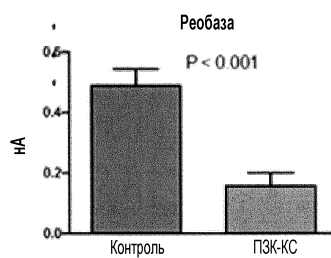
Фиг. 8



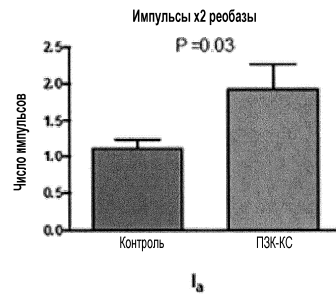
Фиг. 9



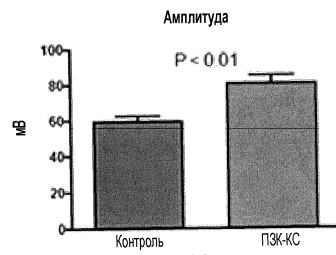
Фиг. 10А



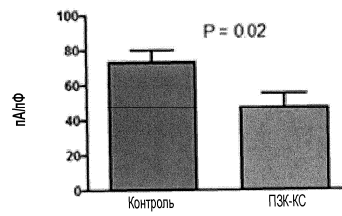
Фиг. 10В



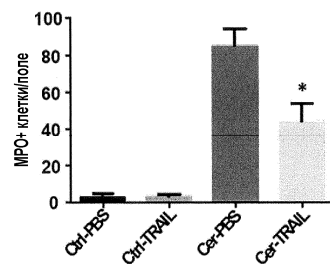
Фиг. 10С



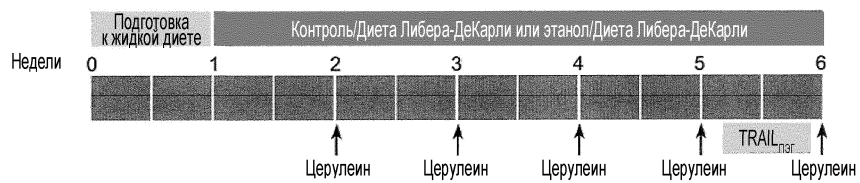
Фиг. 10D



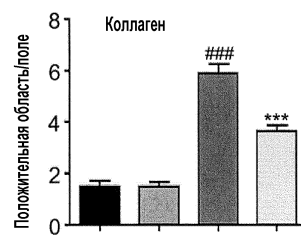
Фиг. 10E



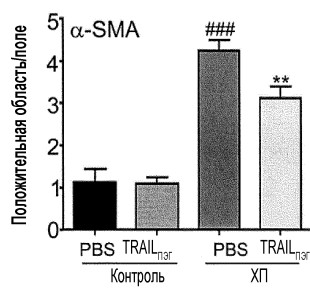
Фиг. 11



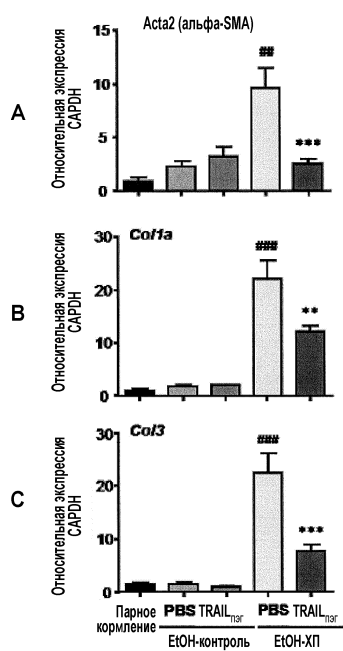
Фиг. 12



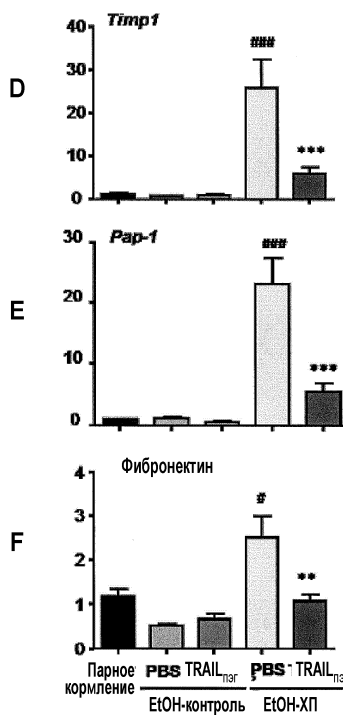
Фиг. 13А



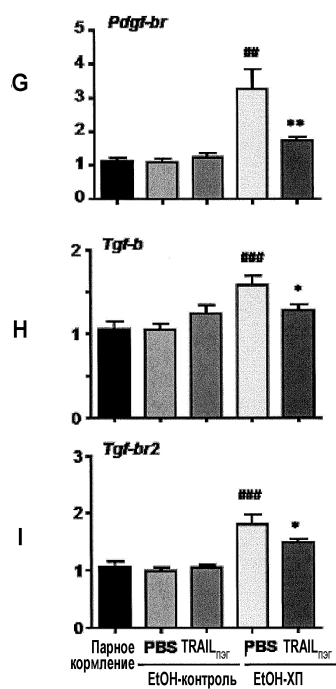
Фиг. 13В



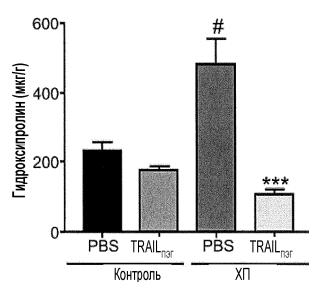
Фиг. 14А, В, С



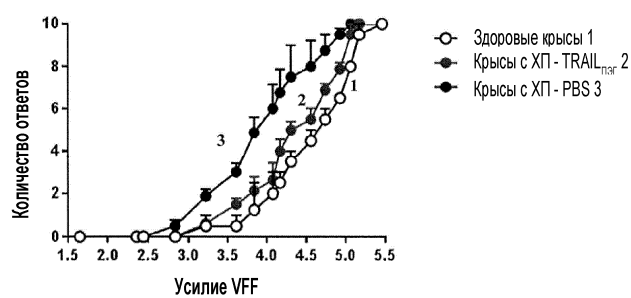
Фиг. 14D, E, F



Фиг. 14G, H, I



Фиг. 15



Фиг. 16



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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