(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 043184 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.27

(21) Номер заявки
201892244

(22) Дата подачи заявки
2017.04.04

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)

(54) МОНОВАЛЕНТНЫЙ ИНГИБИТОР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ huTNFR1

(31) **16163822.6**
(32) **2016.04.05**
(33) **EP**
(43) **2019.04.30**
(86) **PCT/EP2017/057997**
(87) **WO 2017/174586 2017.10.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
УНИВЕРЗИТЭТ ШТУТГАРТ (DE); БАЛИОФАРМ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Контерман Роланд, Пфиценмайер Клаус, Рихтер Фабиан (DE), Цетлиц Кирстин (US), Шойрих Петер (DE), Герман Андреас (CH)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) Kirstin Anja Zettlitz: "Engineered antibodies for the therapy of cancer and inflammatory diseases", 1 January 2012 (2012-01-01), XP055279150, Retrieved from the Internet: URL:http://elib.uni-stuttgart.de/bitstream/11682/2035/1/Diss_Kirstin_Zettlitz.pdf pages 30-90, in particular section 3.2.9.8, page 89, table 3-12

WO-A1-2012035141

WO-A2-2008113515

KONTERMANN ROLAND E. ET AL.: "A humanized tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)-specific antagonistic antibody for selective inhibition of tumor necrosis factor (TNF) action", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY: WITH EMPHASIS ON TUMOR IMMUNOLOGY, RAVEN PRESS, US, vol. 31, no. 3, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 225-234, XP009105439, ISSN: 1067-5583, abstract

RUDIKOFF S. ET AL.: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, no. 6, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP002683593, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979, abstract

STEPHAN DUEBEL ED - STEFAN DUBEL: "Handbook of Therapeutic Antibodies Chapter 6", 1 January 2007 (2007-01-01), HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBO, WILEY-VCH, WEINHEIM, PAGE(S) 119-144, XP007913671, ISBN: 978-3-527-31453-9, section 6.4.4

FABIAN RICHTER ET AL.: "Antagonistic TNF Receptor One-Specific Antibody (ATROSAB): Receptor Binding and In Vitro Bioactivity", PLOS ONE, vol. 8, no. 8, 19 August 2013 (2013-08-19), page e72156, XP055279161, DOI: 10.1371/journal.pone.0072156, abstract, figures, tables 1-2

V. BERGER ET AL.: "An anti-TNFR1 scFv-HAS fusion protein as selective antagonist of TNF action", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, vol. 26, no. 10, 4 September 2013 (2013-09-04), pages 581-587, XP055279872, GB ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/protein/gzt044, abstract, figures, tables I and II

LAURA J. GOODALL ET AL.: "Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Characterisation of an Anti-Mouse TNF Receptor 1 Domain Antibody Formatted for In Vivo Half-Life Extension", PLOS ONE, vol. 10, no. 9, 9 September 2015 (2015-09-09), page e0137065, XP055279877, DOI: 10.1371/journal.pone.0137065, abstract, figures, tables 1-3

(57) Изобретение обеспечивает ингибитор рецептора huTNFR1, который представляет собой человеческую или гуманизированную конструкцию антитела, которая моновалентно узнает huTNFR1 через антигенсвязывающий фрагмент, которая характеризуется специфическими CDR-последовательностями, его фармацевтический препарат, способ получения ингибитора и медицинское применение ингибитора.

043184 B1

043184 B1

Изобретение относится к ингибитору взаимодействия TNF с рецептором huTNFR1, который моновалентно узнает huTNFR1 с высокой аффинностью.

Уровень техники

Фактор некроза опухоли (TNF) представляет собой плейотропный цитокин и центральный медиатор воспаления. Повышенные уровни TNF связаны с различными воспалительными заболеваниями, включая ревматоидный артрит, псориаз и болезнь Крона. Несколько нейтрализующих TNF реагентов были одобрены для лечения этих заболеваний, включая растворимые рецепторы TNF (этанерцепт), а также антитела против TNF (инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол, голимумаб), и в стадии разработки находятся многие другие реагенты. Терапевтическая эффективность хорошо задокументирована с более чем 1 миллионом пациентов, получавших антагонисты TNF. Однако глобальное ингибирование TNF в течение длительного периода времени увеличивает риск возобновления туберкулеза, серьезных инфекций и даже злокачественных новообразований. Поэтому медицинская информация обо всех одобренных анти-TNF лекарственных средствах включает обширные предупреждения и меры предосторожности.

Два рецептора TNF (CD120a, TNFR1 и CD120b, TNFR2) опосредуют передачу сигнала при связывании TNF (Locksley et al., 2001, Cell 104:487-501). Провоспалительные реакции, главным образом, опосредуются повсеместно экспрессируемым TNFR1. TNFR1 активируется как мембранносвязанной формой TNF (mTNF), так и растворимым TNF (sTNF), который получается из mTNF путем протеолитического расщепления. Напротив, TNFR2, экспрессируется более ограниченным образом, например, иммунными клетками, эндотелиальными клетками и нейронами, и может быть активирован только mTNF. Активация TNFR2 в основном индуцирует антиапоптотические сигналы и может привести к клеточной пролиферации in vitro. Кроме того, TNFR2, по-видимому, играет роль в гомеостазе и регенерации тканей.

Избирательное ингибирование передачи сигнала через TNFR1 привлекает все большее внимание как альтернатива глобальной нейтрализации TNF, которая затрагивает оба рецептора TNF (Fischer et al. 2015, Антитела 4:48-70). Недавно, был описан мутеин TNF (RlantTNF) избирательно нейтрализующий активность TNFR1 (Shibata et al. 2008, Cytokine 2:229-33). Данный мутеин TNF, введенный или как немодифицированный, или как PEOилированный белок (PEG-RlantTNF) продемонстрировал терапевтическую эффективность в моделях острого мышечного гепатита и в мышиной модели коллаген-индуцированного артрита. Положительный эффект избирательного ингибирования TNFR1 был дополнительно подтвержден результатами с доминантно-негативным мутеином TNF (XPro1595), который способен образовывать неактивные комплексы с sTNF, таким образом, избирательно ингибируя провоспалительное действие, опосредуемое TNFR1, сохраняя при этом врожденный иммунитет к инфекциям (Olleros et al. 2009, J. Infect. Dis. 199:1053-63).

TNFR1-селективное ингибирование также может быть достигнуто с TNFR1-специфическими антителами. Например, моноклональное мышиное антитело H398 и антитело, описанное в US5736138, с селективностью по отношению к человеческому TNFR1, демонстрируют сильное ингибирование TNF-опосредованной передачи сигнала и цитотоксичности (Moosmayer et al. 1995, Ther. Immunol. 2:31-40).

Гуманизированная версия H398 описана в WO2008/113515A2. Конкретно, гуманизированное антитело, полученное в виде Fab-фрагмента (IZI-06.1) демонстрировало in vitro нейтрализующую активность, сравнимую с таковой Fab-фрагмента родительского антитела. Важно, что антитело H398 не обеспечивало полной блокировки активности TNF, что было интерпретировано как превращение антагониста в частичного агониста при высоких концентрациях. Это объясняется дозозависимым увеличением поперечного сшивания TNFR1, таким образом, потенциально формируя лиганд-независимые функциональные сигнальные комплексы TNFR1.

Попытки в направлении созревания аффинности IZI-06.1 привели к мутанту (scFvIG11), демонстрирующему двукратное увеличение антигенсвязывающей аффинности, которая также была переведена в несколько улучшенное ингибирование TNF-опосредованной цитотоксичности in vitro (Zettlitz KA, tis 2012, Universitat Stuttgart).

Kontermann et al. (Journal of Immunotherapy 2008, 31(3):225-234) описывают фрагмент моновалентного антитела IZI-06.1 как TNFR1-селективного антагониста TNF.

Было обнаружено, что антитела к TNFR1 обладают агонистическим потенциалом, вызывая реакцию, имитирующую лиганд. Этот ответ говорит о том, что передача сигнала инициируется агрегацией рецепторов благодаря связыванию мультивалентных тримеров TNF. В особенности, известно, что двухвалентные антитела против TNFR1 несут риск активации TNFR за счет перекрестного сшивания рецептора, сами вызывая провоспалительные реакции, включая цитотоксичность и апоптоз, что было бы контрпродуктивным при лечении TNF-опосредованных состояний заболевания.

WO2012035141A1 описывает анти-huTNFR1 антитело типа IgG1, называемое ATROSAB, которое имеет модифицированную Fc-область, недостаточную в опосредовании эффекторной функции, которая, как было установлено, ограничивает агонистический потенциал антитела.

Richter et al. (2013, PLoS One 8:e72156) описывают ингибирование взаимодействие TNFR1 с его естественными лигандами TNF и лимфотоксин альфа (LTα) под действием ATROSAB как было измерено

по выходу IL-6 и IL-8 их клеток HeLa и HT1080, соответственно, индуцированному TNF или LTα.

Раскрытие изобретения

Задача заключается в обеспечении улучшенного анти-huTNFR1 агента с улучшенными характеристиками ингибирования TNFR1, избегая при этом каких-либо побочных эффектов, вызываемых присущей агонистической активностью TNF.

Задача решается с помощью заявленного объекта изобретения.

В соответствии с изобретением обеспечивают ингибитор взаимодействия TNF с рецептором huTNFR1, который представляет собой конструкцию человеческого или гуманизированного антитела, которое моновалентно узнает huTNFR1 через антигенсвязывающий фрагмент.

Конкретно, антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который включает CDR-последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельный домен легкой цепи (VL), который включает CDR-последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, в которых

A:

a) CDRH1 последовательность определяют как SEQ ID NO: 1;

b) CDRH2 последовательность определяют как SEQ ID NO: 10;

c) CDRH3 последовательность определяют как SEQ ID NO: 3;

d) CDRL1 последовательность определяют как SEQ ID NO: 4;

e) CDRL2 последовательность определяют как SEQ ID NO: 5; и

f) CDRL3 последовательность определяют как SEQ ID NO: 11; или

B:

a) CDRH1 последовательность представляет собой функционально активный CDR-вариант SEQ ID NO: 1; и/или

b) CDRH2 последовательность представляет собой функционально активный CDR-вариант SEQ ID NO: 10; и/или

c) CDRH3 последовательность представляет собой функционально активный CDR-вариант SEQ ID NO: 3; и/или

d) CDRL1 последовательность представляет собой функционально активный CDR-вариант SEQ ID NO: 4; и/или

e) CDRL2 последовательность представляет собой функционально активный CDR-вариант SEQ ID NO: 5; и/или

f) CDRL3 последовательность представляет собой функционально активный CDR-вариант SEQ ID NO: 11;

или в которых функционально активный CDR-вариант включает не более чем 1 или 2 точечные мутации в соответствующей CDR-последовательности в любом положении, кроме положения 5 в CDRH2 и положения 3 в CDRL3.

Функционально активные CDR-варианты по воплощению B определяют функционально активный варианты ингибитора по воплощению A, в которых функционально активный CDR-вариант последовательности CDRH2 конкретно включает аминокислотную последовательность, в положении 5 которой находится любое из G или S; и функционально активный CDR-вариант последовательности CDRL3 конкретно включает аминокислотную последовательность, в положении 3 которой находится любое из G или S. Функционально активный CDR-вариант специфически определяет высокую аффинность связывания huTNFR1, такую, как описана далее в настоящем документе. Конкретно, функционально активный вариант представляет собой вариант ингибитора с созревшей аффинностью по воплощению A, в особенности, в котором 1, 2, 3, 4, 5 или 6 из CDR-последовательностей представляют собой функционально активные CDR-варианты.

Конкретно, неожиданно оказалось, что описанный в настоящем документе ингибитор обладает улучшенными связывающими свойствами по сравнению с scFvIG11, который ранее был разработан в качестве улучшенной версии IZI-06.1.

Конкретно, антигенсвязывающий фрагмент связывает huTNFR1 с K_D менее чем 5×10^{-9} M и k_{off} менее чем 10^{-3} c^{-1}. Сродство по связыванию и характеристики связывания (ассоциация и диссоциация) специфически определяли в стандартном тесте для определения моновалентного связывания, существенно исключая эффекты авидности двухвалентного связывания. Стандартный тест основан на измерении с помощью пьезокварцевого микровзвешивания (QCM) при физиологической температуре (примерно 37°C, или при 37+/-1°C). Такое измерение аффинности в особенности выполняют в формате Fab. Таким образом, если конструкция антитела представляет собой что-либо отличное от молекулы Fab, то антигенсвязывающий сайт в особенности вводится в соответствующую молекулу Fab для измерения аффинности с помощью QCM при 37°C. Это обеспечивает сопоставимость результатов измерения аффинности моновалентных участников реакции связывания независимо от эффектов авидности, которые могут помешать измерению аффинности. Конкретно, предпочтительно QCM выполняют при умеренной плотности рецепторов. Конкретно, аффинность конструкции антитела, связывающегося с huTNFR1, определяют для Fab-формата с помощью QCM при 37°C и умеренной плотности рецепторов в диапазоне 50-100 Hz,

например, при примерно 50 Hz, или при 50 Hz +/- 10 Hz, или при 50 Hz +/- 5 Hz. Стандартный тест для определения сродства по связыванию с помощью QCM описан ниже в разделе Примеры.

Конкретно, K_D было менее чем 4×10^{-9} M, или менее чем 3×10^{-9} M, или менее чем 2×10^{-9} M, или менее чем 10^{-9} M, или даже менее чем 10^{-10} M.

Конкретно, k_{off} было менее чем 10^{-3}, или менее чем 5×10^{-4} c^{-1}, или менее чем 10^{-4} c^{-1}, или менее чем 10^{-5} c^{-1}.

Конкретно, антигенсвязывающий фрагмент узнает huTNFR1 с k_{on}, равной по меньшей мере 10^5 $M^{-1}\cdot c^{-1}$.

В соответствии со специфическим аспектом, ингибитор непосредственно ингибирует взаимодействие TNF с рецептором huTNFR1 как определено в анализе на основе клеток, предпочтительно, с помощью анализа ингибирования TNFR1-опосредованной гибели клеток в клетках Kym-1, или с помощью анализа ингибирования IL-6 или выход IL-8 из клеток HeLa или клеток HT1080, соответственно. Конкретно, в анализе ингибирования TNFR1-опосредованной гибели клеток в клетках Kym-1 величина IC_{50} была менее чем $5,0\times10^{-9}$ M. Конкретно, в анализе ингибирования выхода IL-6 из клеток HeLa величина IC_{50} была менее чем $4,0\times10^{-8}$ M, или в анализе ингибирования выхода IL-8 из клеток HT1080 величина IC_{50} была менее чем $2,0\times10^{-8}$ M.

Благодаря моновалентному взаимодействию, конструкция антитела с TNF-миметическим агонистическим потенциалом была специфически ликвидирована, в то время как увеличенное сродство по связыванию к TNFR1, конкретно, низкая скорость диссоциации, обеспечивало превосходящее ингибирование TNFR1-зависимых ответов TNF.

В соответствии с дополнительным специфическим аспектом, ингибитор непосредственно ингибирует взаимодействие рецептора huTNFR1 с лимфотоксином альфа, как было определено в анализе на основе клеток, предпочтительно с помощью анализа ингибирования TNFR1-опосредованной гибели клеток в клетках Kym-1, или с помощью анализа ингибирования выхода IL-6 или IL-8 из клеток HeLa и/или из клеток HT1080.

Конкретно, антигенсвязывающий фрагмент включает или состоит из одного или нескольких Fv-домены, которые формируют моновалентный сайт связывания. В соответствии со специфическим аспектом, домены Fv представляют собой домен VH и VL, оба в соединении друг с другом через взаимодействие структуры бета-листов доменов.

В соответствии с одним аспектом, антигенсвязывающий фрагмент специфически узнает эпитоп, включающий удаленный от мембраны CRD1 и субдомен A1 в CRD2 из huTNFR1.

Эпитоп специфического связывания представлен аминокислотами от 1 до 115 в N-концевой области huTNFR1.

В соответствии со специфическим воплощением, конструкция антитела специфически связывается с эпитопом, который представляет собой такой же эпитоп или перекрывается с эпитопом, который узнается антителом H398, как далее описано в настоящем документе. Конкретно, конструкция антитела препятствует связыванию антитела H398 с его эпитопом, так что оно конкурентно связывается с huTNFR1.

Конкретно, конструкция антитела включает, по меньшей мере, домен VH и необязательно домены Fv (в виде VH, ассоциированного или связанного с VL) гуманизированного антитела H398 с созревшей аффинностью. Конкретно, антитело H398 и гуманизированное антитело ATROSAB (как далее описано в настоящем документе) характеризуются CDR-последовательностями, которые включают, или состоят из следующих последовательностей:

SEQ ID NO: 1: H398 CDRH1;
SEQ ID NO: 2: H398 CDRH2;
SEQ ID NO: 3: H398 CDRH3;
SEQ ID NO: 4: H398 CDRL1;
SEQ ID NO: 5: H398 CDRL2;
SEQ ID NO: 6: H398 CDRL3.

Конкретно, конструкция антитела включает домены VH и VL, в которых по меньшей мере один из доменов VH и VL представляет собой функциональный с созревшей аффинностью вариант родительского домена, включающий по меньшей мере одну точечную мутацию в любой из последовательностей определяющей комплементарность области (CDR), в которой

a) родительский домен VH характеризуется CDR-последовательностями: SEQ ID NO: 1 (CDRH1) SEQ ID NO: 2 (CDRH2) и SEQ ID NO: 3 (CDRH3); и

b) родительский домен VL характеризуется CDR-последовательностями: SEQ ID NO: 4 (CDRL1) SEQ ID NO: 5 (CDRL2) и SEQ ID NO: 6 (CDRL3);

данные CDR-последовательности находятся в соответствии с номенклатурой Кэбота.

Конкретно, по меньшей мере одна точечная мутация расположена в любой из SEQ ID NO: 2 (CDRH2) и/или SEQ ID NO: 6 (CDRL3), предпочтительно, в той, где последовательность CDRH2 представляет собой SEQ ID NO: 7 и последовательность CDRL3 представляет собой SEQ ID NO: 8.

Конкретно, 1 или 2 точечные мутации могут быть введены в любую из CDR-последовательностей для получения функционально активных CDR-вариантов. Конкретно, функционально активные CDR-

варианты имеют по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80% идентичности последовательности по сравнению с любой из CDR-последовательностей родительских доменов, предпочтительно по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 90%, или только 1 точечную мутацию в CDR-последовательности, предпочтительно, в которой CDR-последовательность представляет собой или CDRH2, или CDRL3 последовательность.

Конкретно, конструкция антитела включает последовательности с созревшей аффинностью гуманизированного антитела, называемого ATROSAB, которое включает VH- и VL-последовательности для целей созревания аффинности. ATROSAB конкретно характеризуется следующими VH- и VL-последовательностями:

SEQ ID NO: 22: ATROSAB VH;

SEQ ID NO: 23: ATROSAB VL.

Конкретно, антигенсвязывающий фрагмент представляет собой

A) выбранный из группы, состоящей из членов группы от i) до ii) в которой:

i) представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который включает:

a) CDRH1 последовательность, определяемую SEQ ID NO: I;

b) CDRH2 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 10, в которой X в положении 5 представляет собой S;

c) CDRH3 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 3;

d) CDRL1 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 4;

e) CDRL2 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 5; и

f) последовательность CDRL3, определяемую SEQ ID NO: 11, в которой X в положении 3 представляет собой G; и

ii) представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который включает:

a) CDRH1 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 1;

b) CDRH2 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 10, в которой X в положении 5 представляет собой S;

c) CDRH3 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 3;

d) CDRL1 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 4;

e) CDRL2 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 5; и

f) последовательность CDRL3, определяемую SEQ ID NO: 11, в которой X в положении 3 представляет собой S;

или B) антигенсвязывающий фрагмент, который представляет собой функционально активный вариант родительского антигенсвязывающего фрагмента, который представляет собой любого из членов группы A.

Конкретно, функционально активный вариант включает:

a) по меньшей мере один функционально активный CDR-вариант любой из CDR-последовательностей родительского антитела, которая включает не более чем 1 или 2 точечные мутации в соответствующей CDR-последовательности в любом положении, кроме положения 5 в CDRH2 и в положении 3 в CDRL3; и/или

b) по меньшей мере одну точечную мутацию в каркасной области любой из VH или VL-последовательностей.

Функционально активные CDR-варианты специфически характеризуются CDRH2 последовательностью, в которой в аминокислотной последовательности в положении 5 находится любое из G или S; и CDRL3 последовательностью, в которой в аминокислотной последовательности в положении 3 находится любое из G или S. Функционально активный CDR-вариант специфически характеризуется высокой аффинностью связывания huTNFR1, такой, как описана далее в настоящем документе.

Конкретно, одна или несколько точечных мутаций могут быть введены в любую из последовательностей FR для получения функционально активных FR-вариантов, в особенности, человеческих или гуманизированных FR-последовательностей.

Конкретно, функционально активные варианты FR1 любой из VH или VL-последовательностей, включают одну или более, например, несколько точечных мутаций, например, вплоть до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 точечных мутаций для получения варианта последовательности по меньшей мере с 40%, или по меньшей мере 45% идентичности последовательности, или по меньшей мере 50% идентичности последовательности, или по меньшей мере 60% идентичности последовательности, или по меньшей мере 70% идентичности последовательности, или по меньшей мере 80% идентичности последовательности, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности по сравнению с родительской последовательностью FR1.

Конкретно, функционально активные варианты FR2 любой из VH- или VL-последовательностей, включают одну или более, например, несколько точечных мутаций, например, вплоть до 2, 3, 4 или 5 точечных мутаций для получения варианта последовательности по меньшей мере с 70%, или по меньшей мере 80% идентичности последовательности, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности по сравнению с родительской последовательностью FR2.

Конкретно, функционально активные варианты FR3 любой из VH- или VL-последовательностей, включают одну или более, например, несколько точечных мутаций, например, вплоть до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 точечных мутаций для получения варианта последовательности по меньшей мере с 50%, или по меньшей мере 60% идентичности последовательности, или по меньшей мере 70% идентичности последовательности, или по меньшей мере 80% идентичности последовательности, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности по сравнению с родительской последовательностью FR3.

Конкретно, функционально активные варианты FR4 любой из VH или VL-последовательностей, включают одну или более, например, несколько точечных мутаций, например, вплоть до 2, 3, 4 или 5 точечных мутаций для получения варианта последовательности по меньшей мере с 70%, или по меньшей мере 80% идентичности последовательности, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности по сравнению с родительской последовательностью FR4.

В соответствии со специфическим воплощением, конструкцию антитела выбирают из группы, состоящей из молекул Fab, молекул scFv, одиночных вариабельных доменов, дисульфид-стабилизированных Fv (dsFv), антител полу-IgG1 и доменов Fv, или функционально активного производного любого из вышеприведенного, предпочтительно, в котором конструкция антитела соединена с гидрофильным полимером, таким как PEG, и/или слита с полипептидом, таким как человеческий (или мышиный) сывороточный альбумин, трансферрин, альбумин-связывающие домены или пептиды, Ig-связывающие домены или пептиды, PEG-имитирующие полипептидные расширения, Fc-фрагмент антитела, Fc-фрагмент антитела, несущий мутации для обеспечения предпочтительной гетеродимеризации (над гомодимеризацией) или функционального варианта любого из вышеприведенных полипептидов.

Конкретно, конструкция антитела представляет собой любой из доменов Fab, scFv, dsFv или Fv, который слит с фрагментом Fc антитела, в котором Fc состоит из гетеродимера доменов CH2 и CH3, в котором домены CH2 и/или CH3 несут одну или несколько точечных мутаций, которые обеспечивают предпочтительную гетеродимеризацию над гомодимеризацией. Конкретно, один или оба из CH3-доменов в Fc модифицируют для изменения аминокислотной структуры, так чтобы получить Fc, содержащий гетеродимер из доменов CH3/CH3.

Конкретно, конструкция антитела включает домены Fv, слитые с Fc-областью или фрагментом антитела, с дополнительными доменами антитела или без них, тем не менее, поддерживая при этом структуру конструкции антитела с моновалентным связыванием. Конкретный пример относится к Fab-фрагменту или Fv-фрагменту, слитому с Fc или с модифицированным Fc.

Специфические воплощения включают человеческий Fc IgG1, в котором домены CH2-CH3 образуют гетеродимер через одну или несколько мутаций типа "выступы-во-впадины", например, мутации "выступы", модифицирующие поверхность бета-листов CH3, присутствуют на одном мономере CH3 домена, который представляет собой T366W; и мутации "впадины", модифицирующие поверхность бета-листов CH3, присутствуют на другом мономере CH3 домена, которые выбирают из группы, состоящей из T366S, L368A, Y407V.

Конкретно, конструкция антитела включает Fc-область, которая включает одну или несколько мутации для понижающей модуляции эффекторной функции. В соответствии со специфическим аспектом, Fc-область подвергают гликоинженерии для понижающей модуляции эффекторной функции.

Конкретно, конструкция антитела включает Fc-область (человеческий IgG1), которая характеризуется FcγR-выключенными CH2 и CH3 доменами, например, через одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из E233P, L234V, L235A, AG236, A327G, A330S и P331S, S228P, L234A, L235A, H268Q, A330S, P331S, V234A, G237A, P238S, H268A, V309L.

В соответствии с предпочтительным воплощением, конструкция антитела включает Fc-область IgG1, которую мутируют для понижающей модуляции эффекторной функции. Предпочтительно, Fc-область включает тяжелую цепь по меньшей мере с одной мутацией, выбранной из группы, состоящей из E233P, L234V, L235A, AG236, A327G, A330S и P331S (EU-индекс по номенклатуре Кэбота). Предпочтительно по меньшей мере две из указанных мутаций, более предпочтительно по меньшей мере три, четыре, пять или все из шести мутаций были введены в Fc-последовательность человеческого IgG1. Fc-последовательность человеческого IgG1 была специфически включена в аминокислотную последовательность, определяемую как SEQ ID NO: 24. SEQ ID NO: 24 определяет последовательность Fc человеческого IgG1 и шарнирную область (шарнирная область IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 35) плюс CH2-CH3 домены).

Конкретно, конструкция антитела включает гуманизированную или человеческую каркасную область.

Конкретно, конструкция антитела PEGилированы, HESилированы или PSAилированы.

Конкретно, конструкция антитела PEGилирована PEG с молекулярной массой в интервале между 5000 до 150000 г/моль. Иллюстративные конструкции антитела, такие как Fab, представляют собой конструкции, PEGилированные с PEG 40000.

Конкретно, конструкция антитела представляет собой полуантитело IgG1, которое характеризуется только одной частью Fab, шарнирной областью и одной частью Fc, в которой шарнирная область и/или

Fc-часть, (в особенности, Fc человеческого IgG1) включает одну или несколько мутаций, чтобы избежать димеризации тяжелой цепи (Gu et al. (2015) PLoS One 10(1):e0116419), например, выбранных из группы, состоящей из мутации в шарнирной области (SEQ ID NO: 35): C226S, C229S (EU-номенклатура) и мутации в Fc-части: P395A, F405R, Y407R, K409D (EU-номенклатура). Конкретно, конструкция антитела представляет собой слитый белок Fv-Fc, в котором VH слит с первой цепью домена CH2-CH3 через первую шарнирную область, и VL слит со второй цепью домена CH2-CH3 через вторую шарнирную область. Предпочтительно, чтобы первая и вторая цепи домена CH2-CH3 отличались друг от друга одной или несколькими точечными мутациями, такими как мутации, позволяющие преимущественную гетеродимеризацию между первой и второй цепями домена CH2-CH3, с получением в результате препарата Fv-Fc, который характеризуются Fc-гетеродимером, например, через мутации "выступы во впадины", как указано выше. Кроме того, первая и вторая шарнирные области могут быть модифицированы следующим образом: GTDKTHTSPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 42) GTDKTHTCPPSPAPPVAG (SEQ ID NO: 43) или GTDKTHTSPPSPAPPVAG (SEQ ID NO: 44).

Конкретно, конструкция антитела представляет собой дисульфид-стабилизированный Fv (dsFv), который характеризуется одной или несколькими дополнительными (искусственными) дисульфидными связями между доменами. Такие дисульфидные связи получают путем введения одного или нескольких дополнительных цистеиновых остатков в любой из доменов VH и VL в соответствующих положениях, которые могут использоваться в качестве основы для мостика, образуемого дисульфидными связями между доменами VH и VL, дисульфидными связями, получаемыми при восстановлении цистеинов. В соответствии с конкретными примерами, дисульфидная связь может быть введена в Fv в любое из следующих положений в VH и в соответствующие положения в VL: 44C в VH и 100C в VL, 108C в VH и 55C в VL, 106C в VH и 56C в VL, или 101C в VH и 46C в VL.

В соответствии со специфическим аспектом, конструкция антитела включает домены Fv с увеличенной аффинностью для связывания huTNFR1 по сравнению с родительскими Fv-доменами, в которых родительские Fv-домены характеризуются родительским доменом VH, определенным как SEQ ID NO: 12, и родительским доменом VL, определенным как SEQ ID NO: 16.

Конкретно, по меньшей мере один из доменов VH и VL представляет собой функциональный вариант родительского домена с созревшей аффинностью, включающий, по меньшей мере, одну точечную мутацию в любой из CDR-последовательности или каркасной (FR) последовательности.

Конкретно,

a) домен VH включает или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-15, или функционально активный вариант любой из SEQ ID NO: 13-15; и/или;

b) домен VL включает или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-19, или функционально активный вариант любой из SEQ ID NO: 17-19; или

c) в которой функционально активный вариант из a) или b) включает, по меньшей мере, одну точечную мутацию в любой из CDR- или FR-последовательности. Конкретно, функционально активный вариант из a) или b) характеризуется

a) 1 или 2 точечными мутациями в любой из CDR-последовательностей в любом положении кроме в положении 5 в CDRH2 и в положении 3 в CDRL3; и/или

b) по меньшей мере, одной точечной мутацией в каркасной области любой из последовательностей VH или VL.

Конкретно, ингибитор включает комбинацию доменов VH и VL, которую:

A) выбирают из группы, состоящей из членов группы от i) до ix), в которой:

i) VH включает или содержит SEQ ID NO: 13, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 17;
ii) VH включает или содержит SEQ ID NO: 14, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 18;
iii) VH включает или содержит SEQ ID NO: 15, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 19;
iv) VH включает или содержит SEQ ID NO: 14, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 19;
v) VH включает или содержит SEQ ID NO: 15, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 18;
vi) VH включает или содержит SEQ ID NO: 13, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 18;
vii) VH включает или содержит SEQ ID NO: 14, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 17;
viii) VH включает или содержит SEQ ID NO: 13, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 19; и
ix) VH включает или содержит SEQ ID NO: 15, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 17;
или

B) комбинация VH и домена VL любого из членов группы i)-ix) из A, в которой домен VH представляет собой функционально активный вариант любой из SEQ ID NO: 13-15, и/или домен VL представляет собой функционально активный вариант любой из SEQ ID NO: 17-19, этот функционально активный вариант характеризуется:

a) 1 или 2 точечными мутациями в любой из CDR-последовательностей в любом положении кроме положения 5 в CDRH2 и положения 3 в CDRL3; и/или

b) по меньшей мере, одной точечной мутацией в каркасной области любой из последовательностей VH или VL.

Функционально активный вариант может представлять собой функционально активный CDR-вариант, по меньшей мере, с одной точечной мутацией в любой из CDR-последовательностей, и/или функционально активный вариант, по меньшей мере, с одной точечной мутацией в любой из FR-последовательностей. Еще функционально активные CDR-варианты специфически характеризуются последовательностью CDRH2, в которой в аминокислотной последовательности в положении 5 находится любое из G или S; и последовательностью CDRL3, в которой в аминокислотной последовательности в положении 3 находится любое из G или S. Функционально активный CDR-вариант специфически характеризуется высокой аффинностью связывания huTNFR1, такой, как описана далее в настоящем документе.

В соответствии со специфическим аспектом, конструкция антитела имеет повышенную термостабильность по сравнению с конструкцией родительского антитела, в которой конструкция антитела включает Fv-домены, которые представляют собой функциональные варианты родительских Fv-доменов, по меньшей мере, с одной точечной мутацией в каркасной области в любой из последовательностей VH или VL, предпочтительно, в которой последовательность домена VH представляет собой вариацию (родительской) VH-последовательности (SEQ ID NO: 20) IZI06.1 и включает любую из аминокислот (нумерация по Кэботу):

a) в FR1 в положении 1: Q или H;

b) в CDRH2

i) в положении 3: Y или V;

ii) в положении 5: Y, T, или S;

iii) в положении 6: S или Q;

iv) в положении 8: H или E;

v) в положении 10: Y или K;

vi) в положении 13: E или D.

Дополнительная предпочтительная вариация относится к VL-последовательности (SEQ ID NO: 21) и включает точечную мутацию S91G в CDRL3 (положение 3).

Конкретно, термостабильность предпочтительных вариантов конструкции антитела или ингибитора равна, по меньшей мере, 60°C, или по меньшей мере 61°C, или по меньшей мере 62°C или, по меньшей мере, 63°C, или по меньшей мере 64°C, или по меньшей мере 65°C, как определено с помощью динамического рассеяния света.

Изобретение дополнительно обеспечивает фармацевтический препарат, включающий ингибитор, описанный в настоящем документе и фармацевтически приемлемый носитель.

Из-за антагонистических свойств ингибитора и конструкции антитела, фармацевтический препарат может включать высокие концентрации ингибитора, избегая при этом побочных эффектов, возникающих в результате агонистической активности.

В отсутствии полноразмерной структуры иммуноглобулина, ингибитор специфически обладает пониженной иммуногенностью и может быть повторно применен без образования ингибиторов, таких как анти-лекарственные антитела (ADA).

Неожиданно оказалось, что ингибитор может быть применен для лечения пациентов, вырабатывающих ADA, например, тех, которые вырабатывают антитела против иммуноглобулина или иммунотерапевтических средств на основе антител. В предшествующем уровне техники, присутствие таких ADA, в особенности, исключает дополнительные иммунотерапии с антителами, направленными против TNFR1, поскольку ADA имеют потенциал для сшивания антител при связывании TNFR1 на поверхности клетки, тем самым действуя агонистически на передачу сигнала через TNFR1. Однако удивительно, но ингибитор, описанный в настоящем документе, не действует агонистически на передачу сигнала через TNFR1, даже в присутствии ADA.

Конкретно, фармацевтический препарат может быть введен субъектам, которые вырабатывают ADA, например, ADA против анти-huTNFR1 антител или любых структур IgG.

Конкретно, лекарственный препарат составляют для парентерального применения, предпочтительно, путем внутривенного или подкожного введения.

Изобретение дополнительно обеспечивает способ получения ингибитора huTNFR1, описанного в настоящем документе, с применением рекомбинантной системы экспрессии млекопитающих для экспрессии конструкции антитела.

Конкретно, применяют линии клеток-продуцентов, которые представляют собой эукариотические клеточные линии или клеточные линии млекопитающих, включая клеточные линии различного происхождения, например, человека, такие как HEK или PER.C6; хомяка, такие как CHO или BHK; обезьяны, такие как COS-1 или COS-7; мыши, такие как C127, SP2/0 или NS0; или дрожжей, таких как Saccharomyces cerevisiae или Pichia pastoris.

Конкретно, применяли линию клеток-продуцентов CHO.

Альтернативные прокариотические линии клеток-продуцентов включают, например, Escherichia coli.

Изобретение дополнительно обеспечивает ингибитор для медицинского применения, конкретно, для применения в лечении субъекта, представляющего собой человека, нуждающегося в анти-TNF терапии.

Таким образом, изобретение дополнительно обеспечивает способ лечения субъекта, представляющего собой человека, нуждающегося в анти-TNF терапии, путем введения эффективного количества ингибитора, описанного в настоящем документе.

Конкретно, TNFR1-специфический ингибитор применяют в качестве антагониста TNF, неспособного к сшиванию TNFR1, в качестве альтернативы лечению терапевтическим средством на основе анти-TNF. Такого антагониста TNFs, также рассматриваемого как биологического антагониста TNFs, как правило, обеспечивают для применения терапевтического средства там, где доказана биологическая значимость TNFR1-опосредованной функции TNF в патогенезе хронического неинфекционного воспаления суставов, кожи и кишечника.

Специфические к лекарственным средствам антитела (ADA), индуцированные терапевтическими антителами или природными антителами, также могут приводить к нежелательной агонистической активности, из-за способности сшивать связанного с лекарственным препаратом TNFR1 и активации TNFR1-сигналинга. Таким образом, предпочтительная конструкция антитела лишена гомодимеризующейся Fc-области или лишена Fc-области, такой как формат Fab или scFv и соответствующая фармацевтическая композиция с меньшей вероятностью приведет к сшивке и повышенной стимулирующей активности к воспалительным процессам.

В соответствии со специфическим воплощением, ингибитор повторно вводят субъекту.

Предпочтительно, чтобы ингибитор или антитело, описанные в настоящем документе, обладал низким иммуногенным потенциалом и мог быть применен для лечения субъекта, не вызывая нежелательный иммунный ответ на антитело.

С этой целью, предпочтительная конструкция антитела состоит из гуманизированной или человеческой последовательности антитела и, например, лишена гомодимеризующейся Fc-области или лишена Fc-области, такой как формат Fab или scFv. Соответствующая фармацевтическая композиция с меньшей вероятностью приведет к потере толерантности (например, при повторном введении), тем самым улучшая профиль безопасности и эффективности терапевтического средства.

Специфические воплощения относятся к лечению субъектов, страдающих от иммунного ответа или высокого уровня антител против терапевтических антител, в особенности, антител, включающих Fc-область, которые применяли для предыдущих терапий. Таких пациентов предпочтительно лечат с помощью конструкции антитела, описанной в настоящем документе, лишенной гомодимеризующейся Fc-области или лишенной Fc-области.

Конкретно, ингибитор, описанный в настоящем документе, обеспечивают для медицинского применения в лечении субъекта, представляющего собой человека, страдающего от заболевания, при котором показаны анти-TNF терапии или небиологические модифицирующие течение заболевания противоревматические лекарственные средства (DMARD). Конкретно, медицинское применение включает терапию первой линии с эффективным количеством ингибитора, если показаны анти-TNF терапии или небиологические DMARD, или как терапию второй линии, если анти-TNF или небиологические терапевтические средства DMARD не действуют. Конкретно, субъект, страдающий от

a) острого или хронического воспаления суставов, кожи и кишечника, (инфекционного или неинфекционного); и/или

b) аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита, ювенильного артрита, анкилозирующего спондилита, болезни Крона (Morbus Crohn), рассеянного склероза, застойной сердечной недостаточности, заболеваний обмена веществ, синдрома выброса цитокинов, септического шока, острого и хронического нейродегенеративного заболевания, инсульта, болезни Альцгеймера и Паркинсона, язвенного колита, панкреатита, COPD, острых молниеносных вирусных или бактериальных инфекций, заболеваний обмена веществ, хронических нейродегенеративных заболеваний, генетически унаследованных заболеваний с TNF/TNFR1 в качестве причинного патологического медиатора, синдрома периодической лихорадки, херувизма и рака.

В особенности, лечат воспалительные состояния заболевания, которые связаны с любым из перечисленных выше заболеваний. Конкретно, лечат субъекта, страдающего от любого из перечисленных выше заболеваний по a) и любого из заболеваний по b).

В соответствии со специфическим аспектом, изобретение дополнительно обеспечивает изолиро-

ванную нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибитор, описанный в настоящем документе. Конкретно, нуклеиновая кислота функционально связана с некодирующей или кодирующей последовательностью нуклеиновой кислоты, не встречающейся в природе с нуклеиновой кислотой, такой как включающей гетерологичный промотор или регуляторные последовательности. Конкретно, нуклеиновая кислота представляет собой искусственную нуклеиновую кислоту.

Изобретение дополнительно обеспечивает вектор, включающий экспрессионную кассету или плазмиду, каждую, включающую кодирующую последовательность для экспрессии белковой конструкции, включающей или состоящей из полипептида или белка, или производного белка, включающего антиген-связывающий сайт или VH и/или VL ингибиторного антитела, как описано в настоящем документе.

Изобретение дополнительно обеспечивает клетку-хозяина, включающую экспрессионную кассету, экспрессионный вектор или экспрессионную плазмиду, как описано в настоящем документе.

Изобретение дополнительно обеспечивает способ получения ингибитора, как описан в настоящем документе, в котором клетку-хозяина культивируют или поддерживают в условиях для получения указанного антитела.

Конкретно, предпочтительно, чтобы клетка-хозяин и способ получения с применением такой клетки-хозяина были такими, когда клетка-хозяин включает вектор экспрессии, который включает в себя кодирующую последовательность для экспрессии легкой цепи антитела; и вектор экспрессии, который включает в себя кодирующую последовательность для экспрессии тяжелой цепи антитела.

В соответствии со специфическим аспектом, изобретение дополнительно обеспечивает рекомбинантную клетку-хозяина, включающую нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии, описанные в настоящем документе.

Фигуры

Фиг. 1. Связывание H398 и ATROSAB с человеческим TNFR1-Fc. a) Равновесное связывание ATROSAB и H398 анализировали стандартным способом ELISA (n=3, среднее + SD). QCM-кинетику связывания ATROSAB (b) и H398 (c) тестировали в условиях высокой плотности рецепторов (195 Hz). Применяли в трехкратном повторе пяти концентраций между 3,9 нМ и 62,5 нМ.

Фиг. 2. ATROSAB и H398 ингибируют действие TNF. Ингибирование секреции IL-8 из клеток HT1080 возрастающими концентрациями ATROSAB и H398 индуцированной 0,1 нМ TNF (a) и LTα (b). Данные из n=3 экспериментов показаны в процентах от максимального выхода IL, вызванного только TNF или только LTα.

Фиг. 3. Кинетика связывания при низкой плотности рецепторов. Определение аффинности ATROSAB (a) и H398 (b) для человеческого TNFR1-Fc с помощью QCM при плотности рецепторов, равной 48 Hz.

Фиг. 4. Выравнивание последовательности scFvIZI06.1 (VH: SEQ ID NO: 20, VL: SEQ ID NO: 21) с родительскими VH- и VL-последовательностями и вариантами с созревшей аффинностью. a) выровненная VH-последовательность ATROSAB (scFvIZI06.1) scFvIG11, scFvT12B и scFvFRK13.7. b) Выравнивание VL-последовательности. Остатки пронумерованы в соответствии с нумерацией по схеме Кэбота, и точки представляют собой идентичные аминокислоты по сравнению с scFvIZI06.1. Последовательности из 4 аминокислот или более показаны следующим образом. Последовательности в FR1 из scFvFRK13.7: SASV (SEQ ID NO: 36); DRVT (SEQ ID NO: 37). Последовательность в FR3 из scFvFRK13.7: SLQP (SEQ ID NO: 38).

Фиг. 5. Отбор библиотеки EP03. Пул амплифицированных фагов анализировали на общее связывание с человеческим TNFR1-Fc в ELISA после каждого раунда отбора (a). Отобранных кандидатов экспрессировали как растворимые scFv-форматы и тестировали на связывание с человеческим TNFR1-Fc в QCM-измерениях (b). Показаны средние и SD единственного эксперимента с повторами, scFvIZI06.1 и scFvIG11 служили контролями в b.

Фиг. 6. Экспрессия и характеристика scFvT12B. A) scFvT12B и контрольные антитела scFvIZI06.1 и scFvIG11, окрашенный Кумасси в SDS-PAGE (12 %). Связывание с человеческим TNFR-Fc тестировали в анализах ELISA (b) и QCM (c), в которых отображено измерение (пунктирная линия) и аппроксимация (сплошная линия). Выход IL-8, индуцированный ингибированием TNF (0,1 нМ) продемонстрирован в d). b) и d) показывают среднее и SD из двух (d) или трех (b) индивидуальных экспериментов, выполненных в двойных повторах.

Фиг. 7. Выравнивание scFvIZI06.1 (VH: SEQ ID NO: 20, VL: SEQ ID NO: 21) с гуманизированными последовательностями. Гуманизированные последовательности VH (a) и VL (b) выравнивали с последовательностью одноцепочечного вариабельного фрагмента ATROSAB. Идентичные остатки представлены точками. Последовательности из 4 или более аминокислот показаны следующим образом. Последовательность в VH (a) FR1 из FRK13.1 и FRK13.2: GGLV (SEQ ID NO: 39). Последовательности в VH (a) FR3 из FRK13.1 и FRK13.2: NAKNSL (SEQ ID NO: 40) LQMN (SEQ ID NO: 41). Последовательности в VL (b) FR1 из FRK13.1 и FRK13.2: SASV (SEQ ID NO: 36); DRVT (SEQ ID NO: 37). последовательность в VL (b) FR3 из FRK13.1 и FRK13.2: SLQP (SEQ ID NO: 38).

Фиг. 8. Получение гуманизированного scFv антитела. A) генотип гуманизированных вариантов

scFv, скомбинированный с scFvT12B. Очищенные scFv фрагменты анализировали с помощью SDS-PAGE (b, 12%, окрашенный Кумасси) и затем с помощью SEC (c, колонка Yarra SEC-2000, скорость элюции 0,5 мл/мин) в случае надлежащей экспрессии.

Фиг. 9. Связывание с и блокада человеческого TNFR1. Гуманизированные scFv антитела тестировали с помощью ELISA на связывание с человеческим TNFR1-Fc (a) и на ингибирование индуцированного TNF (0,1 нМ) выхода IL-8 из клеток HT1080 (b, выполняли только для сильного связывания scFvs). scFvIZI06.1 и scFvT12B служили контролями (представлены как средние и SD, n=3).

Фиг. 10. Термостабильность гуманизированных фрагментов scFv. Молекулярную стабильность scFv антитела анализировали с помощью динамического рассеяния света. T_m определяли путем визуальной интерпретации представленных точек данных.

Фиг. 11. Экспрессия и очистка IgG13.7 и Fab13.7. Экспрессию и очистку оценивали с помощью SDS-PAGE (a, 12% разделительный гель, восстанавливающие условия; b, 8% разделительный гель, восстанавливающие условия) и гель-фильтрационная хроматография (c, колонка Yarra SEC-2000, скорость элюции 0,5 мл/мин). Указанную молекулярную массу интерполировали в соответствии со стандартными белками с известной массой и временем удерживания.

Фиг. 12. Селективность по видам производных scFv13.7. Связывание IgG13.7 и Fab13.7 с TNFR1 и -2 обоих происхождений, человеческого и мышиного, тестировали в стандартном анализе ELISA. Представлены средние и SD из двух индивидуальных экспериментов.

Фиг. 13. Равновесное связывание FRK13.7 антитела с человеческим TNFR1-Fc. Возрастающие концентрации тестировали на их связывание с huTNFR1-Fc в ELISA (n=3, среднее ± SD).

Фиг. 14. QCM-анализ IgG и Fab, полученных из scFvFRK13.7. Кинетические данные в режиме реального времени взаимодействия ATROSAB (a), FabATR (b), IgG13.7 (c) и Fab13.7 (d) с человеческим TNFR1-Fc регистрировали способом пьезокварцевого микровзвешивания. Анализировали в трехкратном повторе при концентрациях от 64 нМ до 4 нМ (ATROSAB и IgG13.7) или от 128 нМ до 8 нМ (FabATR и Fab13.7).

Фиг. 15. Биологическая активность антитела FRK13.7. Форматы выхода IL-8 из клеток HT1080, вызванного антителом FRK13.7, представлены в a и b (увеличены в размерах, чтобы показать малоактивные и неагонистические конструкции) вместе с выходом IL-6 из клеток HeLa (c). TNF, ATROSAB и FabATROSAB (FabATR) служили контролями. Представлены средние и SD двух индивидуальных экспериментов.

Фиг. 16. Ингибирование TNF-индуцированного выхода интерлейкина под действием Fab13.7. Представлено ингибирование выхода IL-8 (a) и IL-6 (b), индуцированного 0,1 нМ TNF. ATROSAB и FabATROSAB (FabATR) служили контролями. Представлены средние и SD трех индивидуальных экспериментов.

Фиг. 17. Индукция и ингибирование цитотоксичности в Kym-1. Способность IgG13.7 и Fab13.7 запускать гибель клеток в клетках Kym-1 анализировали с помощью KV-окрашивания оставшихся прикрепленных клеток (a). В той же пробе анализировали ингибирующий потенциал Fab13.7 в ингибировании цитотоксичности, индуцированной 0,01 нМ TNF, (b). ATROSAB и FabATR служили контролями. Представлены средние и SD из двух-трех индивидуальных экспериментов (стимуляция цитотоксичности [a] n=2, ингибирование [b] n=3).

Фиг. 18. Поперечная сшивка ATROSAB и Fab13.7. Зависимое от концентрации связывание Fab-специфической поликлональной козьей сыворотки с Fab3.7 продемонстрировали с помощью ELISA (a). В анализе выхода IL-8 анализировали влияние сшитого Fab13.7 на HT1080 по сравнению с ATROSAB (n=2, среднее ± SD), с помощью 64 мкг/мл Fab-специфической козьей сыворотки.

Фиг. 19. Фармакокинетическое исследование Fab13.7 и FabATR. Начальный и конечный период полужизни в плазме после однократной инъекции (25 мкг), а также биодоступность (площадь под кривой) ATROSAB определяли с помощью мышей C57BL/6J (n=3), гомозиготно несущих внеклеточный домен человеческого TNFR1 в локусе гена мыши. Оставшиеся активные антитела в образцах сыворотки определяли с помощью ELISA.

Фиг. 20. Получение и биоактивность $Fab13.7_{PEG}$. a) Генотип $Fab13.7_{PEG}$. b) Модификацию полиэтиленгликолем (PEG) очищенных белков анализировали с помощью SDS-PAGE (12%, окрашивание Кумасси). Применяли различные концентрации TCEP (Трис(2-карбоксиэтил)фосфин) и цепи PEG различной длины (5 кДа, 20 кДа, 40 кДа). c) $Fab13.7_{PEG}$ тестировали с помощью ELISA на связывание с человеческим TNFR1-Fc (n=3, среднее ± SD). d) анализировали выход IL-6 из клеток HeLa, вызванный $Fab13.7_{PEG}$, а также ингибирование TNF-индуцированного выхода IL-6, применяя 0,1 нМ рекомбинантный человеческий TNF (e, n=3, среднее ± SD). f) Начальный и конечный период полужизни в плазме после однократной инъекции (25 мкг), а также биодоступность (площадь под кривой) $Fab13.7_{PEG}$ и белков сравнения Fab13.7 и ATROSAB определяли с помощью мышей C57BL/6J (n=3), гомозиготно несущих внеклеточный домен человеческого TNFR1 в локусе гена мыши. Оставшиеся активные антитела в образцах сыворотки определяли с помощью ELISA.

Фиг. 21. Получение и биоактивность Fab13.7-MSA. a) генотип Fab13.7-MSA. b) Очищенные белок

анализировали с помощью SDS-PAGE (12%, окрашивание Кумасси) и затем с помощью SEC (c, колонка Yarra SEC-2000, скорость элюции 0,5 мл/мин), d) Fab13.7-MSA тестировали с помощью ELISA на связывание с человеческим TNFR1-Fc (n =2, среднее ± SD). e) анализировали выход IL-8 из клеток HT1080, вызванный Fab13.7-MSA (n=1, среднее ± SD из двух повторов), а также ингибирование индуцированного TNF выхода IL-8, применяя 0,1 нМ рекомбинантный человеческий TNF (f, n=2, среднее ± SD). g) Начальный и конечный период полужизни в плазме после однократной инъекции (25 мкг), а также биодоступность (площадь под кривой) Fab13.7-MSA и белков сравнения Fab13.7 и ATROSAB определяли с помощью мышей C57BL/6J (n=3), гомозиготно несущих внеклеточный домен человеческого TNFR1 в локусе гена мыши. Оставшиеся активные антитела в образцах сыворотки определяли с помощью ELISA.

Фиг. 22. Получение и биоактивность IgG13.7$_{half.}$ a) генотип of IgG13.7$_{half.}$ b) Очищенные белок анализировали с помощью SDS-PAGE (12%, окрашивание Кумасси) и затем с помощью SEC (c, колонка Yarra SEC-2000, скорость элюции 0,5 мл/мин), d) IgG13.7$_{half}$ тестировали с помощью ELISA на связывание с человеческим TNFR1-Fc (n=2, среднее ± SD). e) анализировали выход IL-8 из клеток HT1080, вызванный IgG13.7$_{half}$ (n =1, среднее ± SD из двух повторов), а также ингибирование индуцированного TNF выхода IL-8, применяя 0,1 нМ рекомбинантный человеческий TNF (f, n=2, среднее ± SD). g) Начальный и конечный период полужизни в плазме после однократной инъекции (25 мкг), а также биодоступность (площадь под кривой) IgG13.7$_{half}$ и белков сравнения Fab13.7 и ATROSAB определяли с помощью мышей C57BL/6J (n=3), гомозиготно несущих внеклеточный домен человеческого TNFR1 в локусе гена мыши. Оставшиеся активные антитела в образцах сыворотки определяли с помощью ELISA.

Фиг. 23. Получение и биоактивность Fab13.7-Fc$_{kih}$ODS. a) генотип Fab13.7-Fc$_{kih}$ODS. b) Очищенные белок анализировали с помощью SDS-PAGE (12%, окрашивание Кумасси) и затем с помощью SEC (c, Yarra SEC-3000 колонка, скорость элюции 0,5 мл/мин). d) Fab13.7-Fc$_{kih}$ODS тестировали с помощью ELISA на связывание с человеческим TNFR1-Fc (n=2, среднее ± SD). e) анализировали выход IL-8 из клеток HT1080, вызванный Fab13.7-Fc$_{kih}$ODS, (n=2, среднее ± SD), а также ингибирование индуцированного TNF выхода IL-8, применяя 0,1 нМ рекомбинантный человеческий TNF (f, n=2, среднее ± SD). g) Начальный и конечный период полужизни в плазме после однократной инъекции (25 мкг), а также биодоступность (площадь под кривой) Fab13.7-Fc$_{kih}$ODS и белков сравнения Fab13.7 и ATROSAB определяли с помощью мышей C57BL/6J (n=3), гомозиготно несущих внеклеточный домен человеческого TNFR1 в локусе гена мыши. Оставшиеся активные антитела в образцах сыворотки определяли с помощью ELISA.

Фиг. 24. Получение и биоактивность Fv13.7-Fc$_{kih}$ODS. a) генотип of Fv13.7-Fc$_{kih}$ODS. b) Очищенные белок анализировали с помощью SDS-PAGE (12%, окрашивание Кумасси) и затем с помощью SEC (c, Yarra SEC-3000 колонка, скорость элюции 0,5 мл/мин), d) Fv13.7-Fc$_{kih}$ODS тестировали с помощью ELISA на связывание с человеческим TNFR1-Fc (n=1, среднее ± SD из двух повторов), e) анализировали выход IL-8 из клеток HT1080, вызванный Fvl3.7-Fc$_{kih}$ODS (n=2, среднее ± SD), а также ингибирование индуцированного TNF выхода IL-8, применяя 0,1 нМ рекомбинантный человеческий TNF (f, n=2, среднее ± SD). g) Начальный и конечный период полужизни в плазме после однократной инъекции (25 мкг), а также биодоступность (площадь под кривой) Fv13.7-Fc$_{kih}$ODS и белков сравнения Fab13.7 и ATROSAB определяли с помощью мышей C57BL/6J (n=3), гомозиготно несущих внеклеточный домен человеческого TNFR1 в локусе гена мыши. Оставшиеся активные антитела в образцах сыворотки определяли с помощью ELISA.

Фиг. 25. Последовательности антител (SEQ ID NO: 1-33):

SEQ ID NO: 1: CDRH1 из H398 или ATROSAB;
SEQ ID NO: 2: CDRH2 из H398 или ATROSAB;
SEQ ID NO: 3: CDRH3 из H398 или ATROSAB;
SEQ ID NO: 4: CDRL1 из H398 или ATROSAB;
SEQ ID NO: 5: CDRL2 из H398 или ATROSAB;
SEQ ID NO: 6: CDRL3 из H398 или ATROSAB;
SEQ ID NO: 7: CDRH2 варианты SEQ ID NO: 2;
SEQ ID NO: 8: CDRL3 варианты SEQ ID NO: 6;
SEQ ID NO: 9: CDRH2 вариант IG11;
SEQ ID NO: 10: CDRH2 варианты T12B или Fab13.7;
SEQ ID NO: 11: CDRL3 вариант T12B;
SEQ ID NO: 12: VH-последовательность IG11;
SEQ ID NO: 13: VH-последовательность T12B или 13.5 или 13.7;
SEQ ID NO: 14: VH-последовательность 13.1 или 13.3 или 13.6;
SEQ ID NO: 15: VH-последовательность 13.2 или 13.4 или 13.8;
SEQ ID NO: 16: VL-последовательность IG11;
SEQ ID NO: 17: VL-последовательность T12B или 13.6 или 13.8;
SEQ ID NO: 18: VL-последовательность 13.1 или 13.4 или 13.5;
SEQ ID NO: 19: VL-последовательность 13.2 или 13.3 или 13.7;
SEQ ID NO: 20: VH-последовательность scFvIZI06.1;

SEQ ID NO: 21: VL-последовательность scFvIZI06.1;
SEQ ID NO: 22: ATROSAB VH;
SEQ ID NO: 23: ATROSAB VL;
SEQ ID NO: 24: Fc человеческого IgG;
SEQ ID NO: 25: Тяжелая цепь Fab 13.7;
SEQ ID NO: 26: Легкая цепь Fab13.7;
SEQ ID NO: 27: Тяжелая цепь $Fab13.7_{PEG}$;
SEQ ID NO: 28: Тяжелая цепь Fab13.7-MSA;
SEQ ID NO: 29: Тяжелая цепь $IgG13.7_{half}$;
SEQ ID NO: 30: Fd13.7-FcODS;
SEQ ID NO: 31: LC13.7-FcODS;
SEQ ID NO: 32: VH13.7-FcODS;
SEQ ID NO: 33: VL13.7-FcODS;
SEQ ID NO: 34: FAB13.7 MODIFICATION TO INSERT PEG;
SEQ ID NO: 35: $шарнир_{0DS}$;
SEQ ID NO: 36: последовательность, введенная в FR1 из scFvFRK13.7;
SEQ ID NO: 37: последовательность, введенная в FR1 из scFvFRK13.7;
SEQ ID NO: 38: последовательность, введенная в FR3 из scFvFRK13.7;
SEQ ID NO: 39: последовательность, введенная в FR1 из FRK13.1 и FRK13.2;
SEQ ID NO: 40: последовательность, введенная в FR3 из FRK13.1 и FRK13.2;
SEQ ID NO: 41: последовательность, введенная в FR3 из FRK13.1 и FRK13.2;
SEQ ID NO: 42-44: модифицированные шарнирные области.

Примененная в настоящем документе номенклатура имеет следующие значения:
VH CDR1 = CDRH1;
VH CDR2 = CDRH2;
VH CDR3 = CDRH3;
VL CDR1 = CDRL1;
VL CDR2 = CDRL2;
VL CDR3 = CDRL3.

Если не указано иное, отсылки, сделанные в настоящем документе, на CDR-последовательности, пронумерованы в соответствии с Кэбот, т.е. как определено в соответствии с номенклатурой Кэбота (смотри, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services. (1991)), и, в особенности, те CDR-последовательности, которые перечислены в разделе Фигуры. Хорошо понятно, что изобретение и объем формулы изобретения также должен охватывать такие же антитела и CDR, но с другой нумерацией и обозначенной CDR-областью, в которых CDR-области определяют в соответствии с системой IMGT (The international ImMunoGeneTics, Lefranc et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27: 209-212).

Осуществление изобретения

Применение терминов в единственном числе в контексте описываемого изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) должны толковаться как для единственного числа, так и для множественного числа, если в настоящем документе не указано иное, или это явно противоречит контексту.

Термины "включающий", "имеющий", и "содержащий" следует рассматривать как открытые термины (т.е., означающие "включая, без ограничений"), если не указано иное. Для целей настоящего изобретения термин "состоящий из" считается предпочтительный воплощением термина "включающий". Если далее в настоящем документе группу определяют как содержащую, по меньшей мере, определенное число воплощений, это предназначено также для охвата группы, которая предпочтительно состоит только из данных воплощений.

В настоящем документе "ингибитор" описывают как "конструкция антитела" или "антитело". Термин "конструкция антитела", как применен в настоящем документе, также просто называемый "антитело" или "антитело изобретения", должен относиться к неприродным антителам, которые представляют собой искусственные конструкции, сконструированные для моновалентного связывания с мишенью huTNFR1 или полученные расщеплением природных антител на фрагменты. С этой целью, термин "антитело" понимают как охватывающий полипептиды или белки, которые состоят из доменов или включают домены антитела, которые понимают как константный и/или вариабельный домены тяжелых и/или легких цепей иммуноглобулинов, с последовательностью линкера или без нее. Полипептиды понимают как домены антитела, если они включают структуру бета-бочки, состоящей, по меньшей мере, из двух бета-нитей доменной структура антитела, соединенных последовательностью петли. Домены антитела могут иметь нативную структуру или структуру, модифицированную путем мутагенеза или дериватизации, например, для модификации антигенсвязывающих свойств или любое другого свойства, такого как стабильность или функциональные свойства, такие как связывание с FcRn Fc-рецепторов и/или с Fc-гамма рецептором.

Термин конструкция антитела, как применен в настоящем документе, включает, по меньшей мере, один антигенсвязывающий фрагмент, в котором только один антигенсвязывающий фрагмент антитела узнает мишень huTNFR1. Таким образом, конструкция антитела связывается с рецептором huTNFR1 только моновалентно. В особенности, антигенсвязывающий фрагмент включает антигенсвязывающий сайт или домен антитела, который несет сайт связывания антигена. Любой из вариабельных доменов антитела по отдельности или в комбинации может быть применен для построения сайта связывания антигена. Конкретно, антигенсвязывающий сайт образуется комбинацией CDR-последовательностей. Такую комбинацию CDR-последовательностей также следует понимать, как сайт связывания CDR, например, карман для связывания антигена формируется тремя CDR-последовательностями одного вариабельного домена, такими как комбинация из CDRH1, CDRH2 и CDRH3, или комбинация из CDRL1, CDRL2 и CDRL3, или еще шестью CDR-последовательностями из двух вариабельных доменов, такими как комбинация из CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3. Альтернативно, может быть применен антигенсвязывающий сайт, который получают из природного лиганда к рецептору или искусственной конструкции.

Конкретно, сайт связывания CDR одного вариабельного домена антитела может быть применен в качестве сайта связывания антигена, такого как сайт связывания доменов тяжелых и легких цепей вариабельной области (таких как dAb, Fd, VL, Vкаппа, Vлямбда, VH, VHH), или как сайт связывания пары вариабельных доменов антитела, таких как пара VH/VL.

Таким образом, конструкция антитела, включающая сайт связывания CDR, может включать единственный вариабельный домен антитела или пару вариабельных доменов связывания и, необязательно, дополнительно включать другие вариабельные домены, еще с другой специфичностью по связыванию антигена, т.е. биспецифическую или полиспецифическую конструкцию антитела, в которой только один антигенсвязывающий сайт направлен на huTNFR1, и, по меньшей мере, один другой антигенсвязывающий сайт направлен, на мишень, отличную от huTNFR1, поскольку конструкция антитела, как описана далее в настоящем документе, только моновалентно связывается с мишенью huTNFR1. Необязательно, конструкция антитела дополнительно включает константные домены антитела, или комбинации вариабельных и/или константных доменов антитела с последовательностью линкера или шарнирной областью или без нее. Иллюстративные конструкции антитела представляют собой Fab, F(ab') $(Fab)_2$, scFv, Fv или полноразмерное антитело.

Иллюстративные моновалентные, моноспецифические участники реакции связывания представляют собой Fab, scFv, Fv, домен антитела, полуантитела Ig или моновалентные IgG, такие как неполный IgG, состоящий из полной легкой цепи, одной полной тяжелой цепи и дополнительной Fc-цепи, лишенной Fd (Fd = VH-CH1), который может быть получен в соответствии с технологиями выступы во впадины (или других асимметричных частей Fc), для того, чтобы избежать гомодимеризации тяжелых цепей.

Также могут быть применены двухвалентные форматы, в которых только одна валентность узнает мишень TNFR1, а другая валентность узнает другую мишень. Таким образом, биспецифические или олигоспецифические конструкции, включающие два или более сайтов связывания антигенов, могут быть применены, до тех пор, пока только один антигенсвязывающий сайт направлен на рецептор TNFR1.

Термин "полноразмерное антитело" применяют для обозначения любой двухвалентной молекулы антитела, включающего, по меньшей мере, большую часть Fc-домена и других доменов, обычно обнаруживаемых в природном мономере антитела. Данную фразу применяют в настоящем документе, чтобы подчеркнуть, что конкретные молекулы антитела не представляют собой фрагмент антитела.

Термин "Fv" в настоящем документе понимают как область вариабельных доменов, которая включает в себя сайт связывания CDR, например, из VH, VL или VH/VL. Термин "Fv", таким образом, в особенности, относится к любому из VH, VL или VH/VL, который представляет собой домен VH, связанный с доменом VL путем взаимодействия между структурой бета-листа обоих вариабельных доменов, с линкером или без него.

Кроме того, термин "антитело" должен конкретно включать антитела в изолированной форме, который в значительной степени свободны от других антител, направленных против других антигенов-мишеней или включающих другую конструктивную компоновку доменов антитела. Тем не менее, изолированное антитело может быть включено в комбинационный препарат, содержащий комбинацию изолированного антитела, например, по меньшей мере, с одним другим антителом, таким как моноклональные антитела или фрагменты антител, имеющие другие специфичности, или комбинацию дополнительных терапевтически активных веществ и/или вспомогательных веществ.

Термин "антитело" должны применяться к антителам животного происхождения, включая человека, таким как из млекопитающих, включая человека, мышей, кролика, козу, ламу, корову и лошадь, или из птиц, таких как курицы, данный термин в особенности должен включать рекомбинантные антитела, который основаны на последовательности животного происхождения, например, человеческой последовательности. В особенности, термин применяют к конструкциям антитела, включающим или, состоящим из, гуманизированной или человеческой последовательности, которая предпочтительна, если конструкцию антитела обеспечивают для фармацевтических целей для лечения субъекта человека.

В некоторых воплощениях, могут быть применены химерные антитела с последовательностями, ко-

торые происходят из других видов, таких как последовательности мышей и человека.

Термин "химерные", как применен по отношению к антителу, относится к таким антителам, в которых одна часть каждой аминокислотной последовательности тяжелых и легких цепей гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретных видов или принадлежащих к определенному классу, в то время как оставшийся сегмент цепи гомологичен соответствующим последовательностям из другого вида или класса. Как правило, вариабельная область обеих легких и тяжелых цепей имитирует вариабельные области антител, полученных из одного вида млекопитающих, тогда как константные части гомологичны последовательностям антител, полученным из другого вида. Например, вариабельная область может быть получена из известных в настоящее время источников с помощью легкодоступных B-клеток или гибридом из организмов-хозяев, не представляющих собой человека, в комбинации с константными областями, полученными, например, из препаратов клеток человека.

Термин "гуманизированное", как применен по отношению к антителу, относится к молекуле, имеющей сайт связывания антигена, который в значительной степени получен из иммуноглобулина из вида, не представляющего собой человека, в котором оставшаяся структура молекулы основана на структуре и/или последовательности человеческого иммуноглобулина. Сайт связывания антигена может включать или полные вариабельные домены, слитые в константные домены, или только определяющие комплементарность области (CDR), привитые на соответствующие каркасные области в вариабельных доменах. Сайт связывания антигенов может быть дикого типа или модифицированным, например, одной или несколькими аминокислотными заменами, предпочтительно, модифицированным так, чтобы ближе напоминать человеческие иммуноглобулины. Некоторые формы гуманизированного антитела сохраняют все CDR-последовательности (например, гуманизированное мышиное антитело, которое содержит все шесть CDR из мышиного антитела). Другие формы имеют одну или нескольких CDR, которые изменяются по отношению к оригинальному антителу.

Нет никаких ограничений относительно техники гуманизации антитела, до тех пор, пока антитело связывается с желаемым антигеном. Примеры гуманизации включают, без ограничений, пересадку определяющей комплементарность области (CDR-пересадку) (Jones et al. 1986, Nature 321, 522-525), пересадку определяющего специфичность остатка (SDR-пересадку) (Kashmiri et al., 2005, Methods 36, 25-34), изменение поверхности вариабельных доменов (Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 969-973), основанную на структуре селекцию и гуманизацию путем пересадки CDR (Hwang et al., 2005, Methods 36, 35- 42), и стратегии деиммунизации (Hellendom et al., 2004, Cancer Cell International 4 (Suppl. I), 20).

В конкретном воплощении настоящего изобретения, антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой гуманизированное антитело, которое содержит аминокислотные последовательности человеческого происхождения и последовательности, которые происходят не от человека, например, из грызунов.

В предпочтительном воплощении, антитело, описанное в настоящем документе, может включать Fc-область, полученную из гуманизированного антитела, получаемого, например, путем технологии рекомбинантных нуклеиновых кислот. В связи с этим антитело, или по меньшей мере один его фрагмент, может содержать одну или несколько мутаций или вариаций, таких как добавленные, удаленные или замещенные аминокислоты или нуклеиновые кислоты, до тех пор, пока это не оказывает отрицательного эффекта на взаимодействие с huTNFR1. Кроме того, антитело может содержать одну или несколько мутаций или вариаций, таких как добавленные, удаленные или замещенные аминокислоты или нуклеиновые кислоты, которые оказывают положительный эффект на взаимодействие с huTNFR1 и которые улучшают антагонистическую активность указанной молекулы. В особенности, такие мутированные варианты имеют лучшую аффинность и/или лучшую ингибиторную активность.

Например, антитело может представлять собой гуманизированное антитело, имеющее такую же специфичность связывания как мышиное антитело H398, еще, моновалентно связывается с мишенью huTNFR1 и предпочтительно получено из H398, с помощью антитела H398 в качестве родительского антитела. Хотя специфичность связывания предпочтительно одинаковая, особенности этого взаимодействия могут изменяться из-за гуманизации или других мутационных технологий.

Мышиное моноклональное антитело H398 против человеческого TNFR1 характеризуются VH- и VL-последовательностями, как показано в WO2008113515A2. При гуманизации, получают гуманизированные VH и VL-последовательности, которые характеризуются последовательностями как показано в WO2008113515A2 (IZI-06.1 VH (SEQ ID NO: 20), IZI-06.1 VL (SEQ ID NO: 21)). Гуманизированное антитело преобразуют в молекулу IgG1 (ATROSAB), содержащую модифицированную Fc-область, дефицитную в опосредовании эффекторных функций и все еще характеризуемую VH- и VL-последовательностями IZI-06.1 VH и IZI-06.1 VL. Последовательности из WO2008113515A2 включены в настоящий документ путем отсылки.

Очищенные ATROSAB, полученные в клетках CHO, показали сильное связывание со слитым белком TNFR1-Fc человека и макаки резуса и мышиными эмбриональными фибробластами, трансфицированными рекомбинантным слитым белком TNFR1 с аффинностью, идентичной родительскому мышиному антителу H398. С помощью химерных молекул человеческого/мышиного TNFR1, эпитоп ATROSAB

привязывали к N-концевой области (аминокислотные остатки 1-70), включавшей первый обогащенный цистеином домен (CRD1) и субдомен A1 из CRD2. In vitro, ATROSAB эффективно ингибировал типичные TNF-опосредованные ответы, такие как индукция апоптоза и активация экспрессии NFκB-зависимого гена, такой как продукция IL-6 и IL-8.

Поскольку антитело H398 или ATROSAB характеризуются высокой авидностью, но пока еще, средней аффинностью при измерении для Fab-формата (например, если антигенсвязывающий сайт обеспечивают в форме соответствующего Fab-фрагмента) с помощью QCM в физиологических условиях, то ставили цель улучшить возможности терапевтического средства путем увеличения аффинности к TNFR1. Однако при созревании аффинности ATROSAB, полное связывание TNFR1 двухвалентным производным с более высокой аффинностью оказалась очень агонистическим, что создало проблему для лечения пациентов.

Антитело, описанное в настоящем документе, моновалентно связывается с мишенью и тем самым неожиданно преодолевает такую проблему агонистической активности при высоком сродстве, даже если диссоциация антитела от рецептора низка (низкая константа скорости диссоциации k_{off}).

Предпочтительно, антитело, описанное в настоящем документе, имеет специфичность к связыванию с эпитопом, который включает или содержит, в основном, равный, по меньшей мере, мембранодистальный CRD1 и субдомен A1 из CDR2 из huTNFR1.

В конкретном воплощении антитело, описанное в настоящем документе, включает одну или нескольких областей, определяющих комплементарность (CDR) из H398, таких как описаны в WO2008/113515A2, или их частей, придающих связывание с huTNFR1. CDR из H398 или ATROSAB могут быть представлены в любой из комбинаций, например, две, три, четыре, пять или шесть из указанных CDR могут быть представлены. Дополнительно, множественные копии или генетические варианты любой из CDR могут быть представлены в huTNFR1-антитело, описанном в настоящем документе, до тех пор, пока антитело демонстрирует достаточную аффинность к человеческому TNFR1.

Термин "человеческий", как применен по отношению к антителу, подразумевает включение антитела, имеющего вариабельные и константные области, полученные из зародышевых последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческое антитело, описанное в настоящем документе, может включать аминокислотные остатки, не кодируемые зародышевыми последовательностями иммуноглобулина человека (например, мутации введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза in vitro или путем соматических мутаций in vivo), например, в CDR. Человеческие антитела включают антитела, изолированные из библиотек иммуноглобулина человека или из животных, трансгенных по одному или нескольким человеческим иммуноглобулинам.

Термин "антитело" конкретно включает любые антитела из класса или подкласса. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей, антитела могут быть отнесены к основным классам антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и некоторых из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Термин дополнительно применяют к моноклональным или поликлональным антителам, конкретно, к рекомбинантному антителу, данный термин включает все антитела и структуры антитела, которые были получены, экспрессированы, созданы или изолированы с помощью рекомбинантных способов, такие как антитела, происходящие из животных, например, из млекопитающих, включая человека, которые включают гены или последовательности другого происхождения, например, мышиные, химерные, гуманизированные антитела, или антитела, полученные из гибридомы. Дополнительные примеры относятся к антителам, изолированным из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, или к антителам, изолированным из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител или доменов антител, или к антителам, которые были получены, экспрессированы, созданы или изолированы другими способами, включающими сплайсинг последовательности гена антитела с другими последовательностями ДНК.

Понятно, что термин "антитело" также относится к производным антитела, в особенности, функционально активным производным. Производное антитела понимают, как любую комбинацию одного или нескольких доменов антитела или антител и/или как слитый белок, в котором любой домен антитела может представлять собой слитые или соединенные в любом положении один или несколько других белков или химических соединений, таких как другие антитела, например, связывающая структура, включающая CDR-петли, рецепторный полипептид, но также лиганды, каркасные белки, ферменты, токсины и им подобные. Производное антитела может быть получено путем ассоциации или связывания с другими веществами с помощью различных химических технологий, таких как ковалентное связывание, электростатическое взаимодействие, дисульфидные связи и т.п. Другие вещества, связанные с антителом могут представлять собой липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты, органические и неорганические молекулы или любую их комбинацию, например, пролекарства или лекарственные препараты. Специфические воплощения, относящиеся к связыванию антитела с гидрофильным полимером для получения функционально активного производного конструкции антитела, соединенного с гидрофильным полимером, таким как PEG, и/или слитым с полипептидом, таким как человеческий сывороточный альбумин, трансферрин, Ig-связывающие домены, PEG-имитирующие полипептидные удлинения, Fc-фрагмент ан-

тела, или функциональный вариант любого из вышеприведенных полипептидов. Такое функционально активное производное представляет собой, например, конструкцию антитела, соединенную с PEG, HES или PSA. Такую конструкцию антитела модифицируют путем соединения с продлевающим период полужизни фрагментом, таким как полиэтиленгликоль (соединение с PEG), гликозилированный PEG, гидроксиэтилкрахмал (соединение с HES) или полисиаловые кислоты (соединение с PSA). Конкретно, производное получали путем ковалентного присоединения одной или нескольких молекул, продлевающих период полужизни фрагмента.

В соответствии со специфическим аспектом, конструкция антитела, описанная в настоящем документе, включает функционально активный Fc-вариант, который получают из любого природного варианта Fc человеческого IgG (SEQ ID NO: 24).

Функционально активные Fc-варианты могут быть получены путем изменения перечисленных выше последовательностей и характеризуются как имеющие биологическую активность, похожую на активность, проявляемую соответствующей последовательностью, включая способность стабилизировать антитело или придать ему продленное время полужизни. Предпочтительные Fc-варианты, как применены в антителе, описанном в настоящем документе, включают мутации для уменьшения эффекторных функций Fc.

Функционально активные производные, в особенности, получают с помощью слияния или ковалентной химической модификации, которая не изменяет первичную аминокислотную последовательность самого антитела. Производные, например, могут иметь желаемые свойства, включая, например, продление времени полужизни в крови, увеличение стабильности, сокращение клиренса или изменение иммуногенности.

В конкретном воплощении настоящего изобретения, антитело huTNFR1 включает дополнительную метку, позволяющую специфическое взаимодействие с биологически приемлемым соединением. Не существует специфического ограничения по отношению к метке, применяемой в настоящем изобретении, поскольку она не оказывает или оказывает терпимое негативное воздействие на моновалентное связывание huTNFR1-антитела с huTNFR1 или на иммуногенную реакцию, при введении человеку. Примеры подходящих меток включают His-tag, Myc-tag, FLAG-tag, Strep-tag, Calmodulin -tag, GST-tag, MBP-tag и S-tag.

Антитело, описанное в настоящем документе, может быть конъюгировано с меткой или молекулой-рипортером, например, выбранными из группы, состоящей из органических молекул, ферментных меток, радиоактивные меток, окрашенных меток, флуоресцентных меток, хромогенных меток, люминесцентных меток, гаптенов, дигоксигенина, биотина, комплексов металлов, металлов, коллоидного золота и их смесей. Антитела, конъюгированные к меткам или молекулам-рипортерам, могут быть применены, например, в системах анализа или диагностических способах.

Антитело, описанное в настоящем документе, может быть конъюгировано с другими молекулами, которые обеспечивают простое обнаружение указанного конъюгата, например, в анализах связывания (например, ELISA) и исследованиях по связыванию.

Понятно, что термин "антитело" также относится к вариантам антитела, включая антитела с функционально активными CDR-вариантами родительской CDR-последовательности и функционально активный вариант антител родительского антитело.

Конкретно, может быть применено антитело, которое получают из антитела, как в настоящем документе проиллюстрировано его CDR-последовательностями и необязательно его VH- и/или VL-последовательностями. Таким образом, приведенные в качестве примера антитела могут служить в качестве родительского антитела для получения производных, в которых получают одну или несколько из CDR-областей или CDR-вариантов, сохраняя при этом функциональную активность.

Антитела, полученные из родительского антитела или последовательности антитела, такой как родительская CDR- или FR-последовательность, в настоящем документе, в особенности, понимают как мутанты или варианты родительской последовательности, полученной с помощью, например, конструирования in silico или рекомбинантного конструирования или иначе путем химической дериватизации или синтеза.

Конкретно, антитело, полученное из антитела, как описано в настоящем документе, может включать, по меньшей мере, одну или несколько его CDR-областей или CDR-вариантов, например, по меньшей мере, 3 CDR вариабельной области тяжелой цепи и/или, по меньшей мере, 3 CDR вариабельной области легкой цепи, по меньшей мере, с одной точечной мутацией, по меньшей мере, в одной из CDR- или FR-областей, или в константной области HC или LC, проявляющих функциональную активность.

Термин "вариант", в особенности, должен относится к таким антителам, как мутантные антитела или фрагменты антител, например, полученные способами мутагенеза, в особенности, для удаления, обмена, введения вставок в специфическую аминокислотную последовательность или область антитела или для химической дериватизации аминокислотной последовательности, например, в константные домены для конструирования стабильности, эффекторной функции или времени полужизни антитела, или в вариабельные домены для улучшения антигенсвязывающих свойств, например, с помощью технологий созревания аффинности, доступных в данной области техники. Может быть применен любой из извест-

ных способов мутагенеза, включая точечные мутации в желаемых положениях, например, полученные технологиями рандомизации. В некоторых случаях положения выбирают случайным образом, например, или с любой из возможных аминокислот или отбором предпочтительных аминокислот для рандомизации последовательностей антитела. Термин "мутагенез" относится к любой признанной в данной области техники технологии для изменения полинуклеотидной или полипептидной последовательности. Предпочтительные типы мутагенеза включают мутагенез путем ПЦР с внесением ошибок, насыщающий мутагенез или другой сайт-направленный мутагенез.

Термин "вариант" должен специфически охватывать функционально активные варианты.

Термин "функционально активный вариант" CDR-последовательности, как применен в настоящем документе, понимают, как "функционально активный CDR-вариант" и "функционально активный вариант" антитела, как применено в настоящем документе, понимают как "функционально активный вариант антитела". Функционально активный вариант означает последовательность, полученную в результате модификации данной последовательности (родительское антитело или родительская последовательность) путем вставки, делеции или замены одной или нескольких аминокислот, или химической дериватизации одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, или нуклеотидов в рамках нуклеотидной последовательности, или на одном или на обоих дистальных концах последовательности, например, в CDR-последовательности 1 или 2 аминокислоты на N-конце и/или С-конце, и/или в центре 1 или 2 аминокислоты (т.е. в середине CDR-последовательности), и данная модификация не влияет, в особенности, не мешает, активности данной последовательности. В случае сайта связывания, имеющего специфичность к селективному антигену-мишени, функционально активный вариант антитела будет по-прежнему иметь ту же или предопределенную специфичность связывания, хотя это может быть изменено, например, путем изменения тонкой специфичности к специфическому эпитопу, сродства, авидности, k_{on} или k_{off} скорости и т.п. Например, антитело с созревшей аффинностью конкретно понимают как функционально активный вариант антитела. Следовательно, модифицированную CDR-последовательность в антителе с созревшей аффинностью понимают, как функционально активный CDR-вариант.

В предпочтительном воплощении функционально активный вариант родительского антитела

a) представляет собой биологически активный фрагмент антитела, фрагмент, включающий, по меньшей мере, 50% последовательности молекулы, предпочтительно, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, или по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 97, 98 или 99%;

b) получают из антитела путем, по меньшей мере, одной аминокислотной замены, вставки и/или делеции, в котором функционально активный вариант имеет идентичность последовательности к молекуле или к ее части, такой как антитело, равную, по меньшей мере, 50% идентичности последовательности, предпочтительно, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, более предпочтительно, по меньшей мере, 80%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, даже более предпочтительно, по меньшей мере, 95% и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 97%, 98% или 99%; и/или

c) состоит из антитела или его функционально активного варианта и дополнительно, по меньшей мере одной аминокислоты или нуклеотида, гетерологичных полипептиду или нуклеотидной последовательности.

В одном предпочтительном воплощении изобретения, функционально активный вариант антитела, описанный в настоящем документе, в основном идентичен описанному выше варианту, но отличается от его полипептидной или нуклеотидной последовательности, соответственно, тем, что его получают из гомологичной последовательности другого вида.

Конкретно, функционально активные конструкции антитела, варианты или производные, как описано в настоящем документе, функционально активны в отношении связывания антигена TNFR1, в особенности, высокой аффинностью связывания (в особенности как определено по K_D и k_{off}), и дополнительно учитывая возможность избегать любых потенциальных агонистических побочных эффектов, например, как определено в анализе на основе клеток. В иллюстративных анализах для определения ингибирования опосредованной TNFR1 гибели клеток применяют клетки Kym-1. Дополнительно, в иллюстративных анализах для определения TNF- или LTальфа-опосредованного воспалительного ответа определяют ингибирование выхода IL-6 или IL-8 из клеток HeLa или клеток HT1080, соответственно. Такие анализы приведены в разделе Примеры.

Функционально активные варианты могут быть получены, например, путем изменения последовательности родительского антитела, например, антитела, включающего такой же сайт связывания как любое из антител, перечисленное в разделе

Фигуры, но с модификациями в области антитела помимо сайта связывания, или полученное из такого родительского антитела путем модификаций в сайте связывания, но которые не запрещают связывание антигена и предпочтительно будут иметь в значительной степени такую же биологическую активность как родительское антитело или даже улучшенную активность, включая способность специфически или избирательно связывать антиген TNFR1, например, с высокой аффинностью и необязательно путем

высокой скорости ассоциации и низкой скорости диссоциации для связывания антигена.

Первичная функция конструкции антитела, как описано в настоящем документе, это - функция ингибитора взаимодействия TNF-huTNFR1. Термин "ингибитор", как понимают в настоящем документе, представляет собой вещество, обладающее способностью к:

a) модулированию (например, снижению или устранению) TNFR1-сигналинга in vitro и/или in vivo, и/или

b) ингибированию TNFR1-опосредованной гибели клеток in vitro и/или in vivo, и/или

c) ингибированию TNF-опосредованной клеточной стимуляции для выхода воспалительных цитокинов in vitro и/или in vivo, путем ингибирования TNFR1-сигналинга или другим механизмом. Такая способность или функция специфически считается желаемой биологической активностью в соответствии с предметом изобретения. В особенности, ингибитор, как описан в настоящем документе, препятствует связыванию одной или нескольких молекул TNF с одной или несколькими молекулами TNFR1 на поверхности клетки. Для применений в качестве терапевтического средства, не будучи связанными теорией, ингибиторы взаимодействия TNF-huTNFR1 субъекта изобретения могут иметь способность ингибировать huTNFR1-сигналинг в присутствии TNF, или huTNFR1-опосредованную гибель клеток в присутствии TNF, или ингибировать клеточную стимуляцию выхода воспалительных цитокинов в присутствии TNF. Лечение воспалительного нарушения или заболевания может протекать под действием противовоспалительной активности ингибитора взаимодействия TNF-huTNFR1, независимо от лежащего в основе механизма. Путем понижающего модулирования или блокирования белок-белкового взаимодействия TNF-huTNFR1, может быть достигнут эффект на воспалительные заболевания.

Как применен в настоящем документе, термин "сигналинг" и "передача сигнала" представляет собой биохимический процесс, включающий передачу экстраклеточных стимулов, посредством рецепторов клеточной поверхности через специфические и последовательные серии молекул, к генам в ядре, приводящий в результате к специфическим клеточным ответам на стимулы.

Ингибирование взаимодействия huTNFR1 может привести к понижающей модуляции эффектов TNFR1-сигналинга или передачи сигнала, как измеряют ex vivo в анализе на основе клеток или in vivo дозозависимым путем. Функциональная активность ингибитора или конструкций и вариантов или производных антитела специфически характеризуется ингибиторной функцией, которая ингибирует взаимодействия TNF-huTNFR1 или взаимодействия LTa-huTNFR1 in vivo, как определено в ex vivo анализе на основе клеток. Дополнительный анализ может быть применен для исключения существенных побочных эффектов, связанных со сшиванием рецептора TNFR1, который агонистичен взаимодействию TNF-TNFR1. Подходящий анализ выявляет активность антитела или варианта в клетках HeLa или HT1080 на отсутствие стимулирующей активности в продукции воспалительных цитокинов IL-6 или IL-8, соответственно. Иллюстративный тест описан ниже в разделе Примеры.

Ингибирование, как правило, приводит к снижению эффектов взаимодействия или активности huTNFR1, по меньшей мере, на 50%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или на максимальный уровень. Способы получения и характеристики ингибитора или антитела, описанные в настоящем документе, хорошо известны в данной области техники. В предпочтительном воплощении, получают варианты антитела и проводят скрининг на предопределенные свойства с помощью одного или нескольких основанных на клетках анализов, применяя экспрессирующие huTNFR1 клетки или in vivo анализы. Для таких анализов, антитело, как правило, добавляют экзогенно, так что клетки могут быть связаны, например, в присутствие и в отсутствии TNF для определения антагонической и агонистической активности. Данные анализы, как правило, основаны на функции иммуноглобулина; которая представляет собой способность антитела связываться с huTNFR1 и опосредует некоторое биохимическое событие, например, блокирование связывания TNF с указанными клетками, например, в анализе конкурентного связывания, ингибирование связывания TNF/рецептор, снижение экспрессии цитокинов в присутствие или в отсутствии TNF, конкретно, воспалительных интерлейкинов, таких как IL-6 или IL-8, апоптоза и им подобные.

Такие анализы часто вовлечены в мониторинг ответа клеток на антитело, например, выживаемость клеток, гибель клеток, изменение в клеточной морфологии, или в активацию транскрипции, такую как клеточная экспрессия природного гена или репортерного гена. Для некоторых анализов может потребоваться добавлять дополнительные клетки или компоненты, которые служат дополнением к клеткам-мишеням, например, сывороточный комплемент, или эффектор клетки, такие как моноциты периферической крови (PBMC), NK-клетки, макрофаги и им подобные. Такие дополнительные клетки могут происходить из любого организма, предпочтительно, человека, мыши, крыса, кролика и обезьяны.

Способы мониторинга гибели или жизнеспособности клеток известны в данной области техники и включают применение красителей, иммунохимических, цитохимических и радиоактивных реагентов. Например, анализы окрашиванием на каспазы могут позволить измерение апоптоза, а поглощение или выход радиоактивных веществ или флуоресцентных красителей, таких как аламар синий могут позволить следить за ростом или активацией клеток.

Транскрипционная активация также может служить способом анализа функции в основанных на клетках анализах. В таком случае, ответ можно контролировать путем анализа природных генов или им-

муноглобулинов, которые могут быть подвергнуты повышающей регуляции, например, может быть измерен выход определенных интерлейкинов, или альтернативно, считывание может происходить через конструкцию репортера. В основанные на клетках анализы также могут быть вовлечена мера морфологических изменений клеток, как ответ на присутствии антитела, описанного в настоящем документе.

Антитело, описанное в настоящем документе, предпочтительно имеет только TNF-антагонистическую активность (в особенности, без детектируемой агонистической активности), таким образом, снижая воспалительную реакцию, вызванную повышенным уровнем TNF в кровотоке, что может привести к не желаемым воспалительным ответам, апоптозу и некрозу, недостаточности органов и септическому шоку. Предпочтительное антитело имеет антагонистическую активность, соответствующую IC_{50} менее чем 100 нМ, предпочтительно, менее чем 20 нМ, более предпочтительно, менее чем 10 нМ, наиболее предпочтительно в одноразрядном цифровом наномолярном диапазоне или менее, как измеряют в анализе на основе клеток с применением TNF или LTальфа в концентрациях с полумаксимальным насыщением, предпочтительно, в диапазоне 0,01-0,1 нМ TNF и LTальфа, соответственно, например, с помощью тест-системы, как описано далее в приведенных ниже примерах.

Потенциал TNF-имитирующей агонистической активности предпочтительно измеряли в таком же анализе на основе клеток, однако, без применения TNF, например, с помощью тест-системы, как описано далее в приведенных ниже примерах. Антитело, описанное в настоящем документе, предпочтительно не имело значительной агонистической активности, если инкубация клеток HeLa или HT1080 в отсутствии TNF не приводила к индукции цитокина или приводила только к несущественной индукции цитокина, например, повышала уровни IL-6 или IL-8 менее чем на 0,5 нг/мл при концентрации антитела, равной, по меньшей мере, 5 нМ или около 10 нМ. Предпочтительно, не было продукции или была только несущественная или отрицательная продукция цитокина, которую можно определить по количеству менее чем 10 пг/10^5 клеток. В предпочтительном примере экспрессия и выход цитокинов были менее чем 2,5 пг/100 000 клетки за 18 ч. Предпочтительно, агонистическая активность, таким образом, была ниже базального уровня, или менее чем 2% от ответа при сопоставимой концентрации TNF, предпочтительно, менее чем 1% от эквивалентного или максимального ответа TNF.

Антитело, описанное в настоящем документе, предпочтительно, не имеет значительной агонистической активности, если инкубация клеток HeLa или HT1080 в отсутствии TNF приводила только к несущественной индукции цитокина, менее чем 2% ответа при сопоставимой концентрации TNF, предпочтительно, менее чем 1% от эквивалентного ответа TNF.

В особенности, было доказано, что иллюстративное антитело, описанное в настоящем документе, не вызывало экспрессию или выход воспалительных цитокинов, таких как IL-6 или IL-8. Таким образом, можно избежать нежелательных воспалительных состояний или повреждения тканей, несмотря на высокую аффинность связывания TNFR1. Снижение таких побочных реакций в особенности полезно для обеспечения фармацевтических препаратов для лечения хронических заболевания.

Термин "в значительной степени такую же биологическая активность", как применен в настоящем документе, относится к активности, как указано в значительной степени такой же активностью, равной, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 90%, например, по меньшей мере, 100%, или по меньшей мере 125%, или по меньшей мере 150%, или по меньшей мере 175%, или например, вплоть до 200%, или даже более высокой активностью, как определено для антитела сравнения или родительского антитела.

Предпочтительные конструкции антитела, как описано в настоящем документе, функционально активные по отношению связывания антигена huTNFR1, предпочтительно, имеющего высокую аффинность связывания антигена с K_D менее чем 5×10^{-9} М, или менее чем 4×10^{-9} М, или менее чем 3×10^{-9} М, или менее чем 2×10^{-9} М, или менее чем 10^{-9} М, или менее чем 10^{-10} М. Конкретно, тенденция к диссоциации была низкой, с k_{off} менее чем 10^{-3} c^{-1}, или менее чем 5×10^{-4} c^{-1} или менее чем 10^{-5} c^{-1}. Конкретно, тенденция к ассоциации была высокой, с k_{on}, равной, по меньшей мере, 10^5 $M^{-1}\cdot c^{-1}$ или 10^6 $M^{-1}\cdot c^{-1}$.

Предпочтительные варианты антител по-прежнему специфически узнают мишень huTNFR1, с возможным увеличением аффинности и/или снижением диссоциации и/или увеличением ассоциации для эффективного связывания мишени и поддержания взаимодействия антиген-антитело в течение длительного периода времени. По-прежнему, различия в величинах K_D, k_{off}, и/или k_{on} могут представлять собой 1, 2, или 3 logs, например, полученные с помощью созревания аффинности антитела.

Аффинность связывания антитела обычно характеризуется в терминах концентрации антитела, при которой половина сайтов связывания антигена занята, известных как константа диссоциации (K_D или K_D). Обычно, участника реакции связывания рассматривают как связывающегося с высокой аффинностью с $K_D<10^{-8}$ М, в некоторых случаях, например, для терапевтических целей с более высокими аффинностями, например, с $K_D<10^{-9}$ М, даже более предпочтительно с $K_D<10^{-10}$ М.

Тем не менее, в особенно предпочтительном воплощении аффинность связывания антигена характеризуется умеренным сродством, например, с K_D менее чем 10^{-7}. Умеренная аффинность участников реакции связывания может быть обеспечена и конкретно может быть применена для конструирования варианта с созревшей аффинностью с желаемыми аффинными свойствами, который может быть приме-

нен в качестве ингибитора, описанного в настоящем документе.

Созревание аффинности представляет собой процесс, с помощью которого получают антитела с увеличенной аффинностью для мишени-антигена. Любой один или несколько способов получения и/или способов с помощью библиотек созревания аффинности, доступных в данной области, может быть применен для того, чтобы генерировать антитела с созревшей аффинностью в соответствии с различными воплощениями изобретения, раскрытыми в настоящем документе. Иллюстративные способы и применения такого созревания аффинности, такие как случайный мутагенез, пассирования штаммов бактериальных мутаторов, сайт-направленный мутагенез, нацеливание на горячие точки мутагенеза, экономный мутагенез, перетасовка в антителах, перетасовка в легкой цепи, перетасовка в тяжелой цепи, мутагенез CDR1 и/или CDR1 и способы продуцирования и способы с помощью библиотек созревания аффинности. поддающиеся реализации способы и применения в соответствии с различными воплощениями изобретения, раскрытыми в настоящем документе, включая, например, раскрытые в работе: Wark & Hudson, 2006, Advanced Drug Delivery Reviews 58: 657- 670.

Со структурными изменениями антитела, включая мутагенез аминокислот или как следствие соматическую мутацию в сегментах гена иммуноглобулина, получают варианты сайта связывания с антигеном и отбирают на увеличение аффинности. Антитела с созревшей аффинностью могут демонстрировать в несколько log большую аффинность, чем родительское антитело. Единственное родительское антитело может представлять собой субъект для созревания аффинности. Альтернативно, пулы антител со сходной аффинностью связывания с антигеном-мишенью могут рассматриваться как родительские структуры, которые варьируют для получения единственного антитела с созревшей аффинностью или пула таких антител с созревшей аффинностью.

Предпочтительный вариант антитела с созревшей аффинностью, описанный в настоящем документе, демонстрирует, по меньшей мере, 2-кратное увеличение в сродстве по связыванию, предпочтительно, по меньшей мере, 5-, предпочтительно, по меньшей мере, 10-, предпочтительно, по меньшей мере, 50-, или предпочтительно, по меньшей мере, 100-кратное увеличение. Созревание аффинности может быть применено в ходе отбора с применением соответствующей библиотеки родительских молекул, или с антителами, имеющими умеренную аффинность связывания, для получения антител, описанных в настоящем документе. Альтернативно, аффинность может быть еще более увеличена путем созревания аффинности антитела, описанного в настоящем документе, для получения высоких значений, соответствующих k_D менее чем 10^{-10} М или даже менее чем 10^{-11} М.

В определенных воплощениях, аффинность связывания определяют по аффинности в анализе ELISA. В определенных воплощениях аффинность связывания определяют с помощью анализов BIAcore, ForteBio или MSD. В определенных воплощениях аффинность связывания определяют кинетическим способом. В определенных воплощениях аффинность связывания определяют способом равновесия/разведения. В определенных воплощениях аффинность связывания определяют стандартными измерениями с помощью пьезокварцевого микровзвешивания (QCM), в особенности, в предопределенных условиях, которые напоминают физиологические условия (примерно 37°C, плотность примерно 50 Гц).

Термин "функционально активный вариант" также включает природные аллельные варианты, а также мутанты или любые другие неприродные варианты. Как известно в данной области техники, аллельный вариант представляет собой альтернативную форму (поли)пептида, которая характеризуется как имеющая замену, делецию или вставку одной или нескольких аминокислот, которые в основном не меняют биологическую функцию полипептида.

Функционально активные варианты могут быть получены путем изменения последовательности в полипептидной или нуклеотидной последовательности, например, с помощью одной или нескольких точечных мутаций, так что изменение в последовательности сохраняет или улучшает функцию неизменной полипептидной или нуклеотидной последовательности, при применении в комбинации изобретения. Такие изменения последовательности могут включать, без ограничений, (консервативные) замены, дополнения, делеции, мутации и вставки.

Специфические функционально активные варианты представляют собой конструкции антитела, включающие CDR-варианты. CDR-вариант включает аминокислотную последовательность, модифицированную, по меньшей мере, одной аминокислотой в CDR-области, в которой указанная модификация может представлять собой химическое или частичное изменение аминокислотной последовательности, данная модификация позволяет варианту сохранять биологические характеристики немодифицированной последовательности. Частичное изменение аминокислотной последовательности CDR может быть произведено делецией или заменой от одной до нескольких аминокислот, например, 1 или 2, или даже более, вплоть до 3, 4 или 5 аминокислот, или добавлением или вставкой от одной до нескольких аминокислот, например, 1 или 2, или даже более, вплоть до 3, 4 или 5 аминокислоты, или химической дериватизацией от одной до нескольких аминокислот, например, 1 или 2, или даже более, вплоть до 3, 4 или 5 аминокислоты, или их комбинацией. Замены в аминокислотных остатках могут представлять собой консервативные замены, например, замещение одной гидрофобной аминокислоты на альтернативную гидрофобную аминокислоту.

Консервативные замены - это замены, которые происходят в семействе аминокислот, которые

сходны по своим боковым цепям и химическим свойствам. Примеры таких семейств представляют собой аминокислоты с основными боковыми цепями, с кислотными боковыми цепями, с неполярными алифатическими боковыми цепями, с неполярными ароматическими боковыми цепями, с незаряженными полярными боковыми цепями, с небольшими боковыми цепями, с большими боковыми цепями и т.п.

Точечную мутацию, в особенности, понимают как конструирование полинуклеотида, которое приводит к экспрессии аминокислотной последовательности, которая отличается от несконструированной аминокислотной последовательности заменой или обменом, делецией или вставкой одной или нескольких единственных (непоследовательных) аминокислот или дублетов аминокислот для разных аминокислот.

Некоторые точечные мутации в каркасной области будут увеличивать технологичность изготовления, например, путем улучшения их экспрессии в линии клеток-хозяев для рекомбинантной продукции. Некоторые воплощения будут также включать точечные мутации в каркасной области для улучшения стабильности in vivo и/или in vitro, например, как определено по их термостабильности. Например, VH-последовательность может включать одну или более, несколько точечных мутаций, для которых показано значительное увеличение термостабильности антитела. Термостабилизированные варианты, представляют собой, например, варианты конструкции антитела, включающей VH и VL-последовательности из IZI06.1 (VH: SEQ ID NO: 20, VL: SEQ ID NO: 21), в которой домен VH-последовательности представляет собой вариацию (родительской) IZI06.1 VH-последовательности (SEQ ID NO: 20) и включает любую из аминокислот (нумерация по Кэботу):

a) в FR1 в положении 1: Q или H;

b) в CDRH2

i) в положении 3: Y или V;

ii) в положении 5: Y, T, или S;

iii) в положении 6: S или Q;

iv) в положении 8: H или E;

v) в положении 10: Y или K;

vi) в положении 13: E или D.

Дополнительная предпочтительная вариация относится к VL-последовательности (SEQ ID NO: 21) и включает точечную мутацию S91G в CDRL3 (положение 3).

Альтернативные зародышевые последовательности могут быть применены для целей гуманизации, которая может привести к дополнительным FR-вариантам, включающим ограниченное число точечных мутаций и, к вариантам которые опять будут иметь увеличенную термостабильность.

Иллюстративный анализ для определения термостабильности обеспечивают ниже в разделе Примеры.

Предпочтительные точечные мутации относятся к обмену аминокислотами такой же полярности и/или заряда. В этом отношении, аминокислоты, относящиеся к двадцати природным аминокислотам, кодируются шестьюдесятью четырьмя триплетными кодонами. Данные 20 аминокислот могут быть разделены на имеющие нейтральные заряды, положительные заряды и отрицательные заряды:

"Нейтральные" аминокислоты приведены ниже вместе с их соответствующим трехбуквенным и однобуквенным кодом и полярностью:

аланин: (Ala, A) неполярная, нейтральная;

аспарагин: (Asn, N) полярная, нейтральная;

цистеин: (Cys, C) неполярная, нейтральная;

глутамин: (Gln, Q) полярная, нейтральная;

глицин: (Gly, G) неполярная, нейтральная;

изолейцин: (Ile, I) неполярная, нейтральная;

лейцин: (Leu, L) неполярная, нейтральная;

метионин: (Met, M) неполярная, нейтральная;

фениналанин: (Phe, F) неполярная, нейтральная;

пролин: (Pro, P) неполярная, нейтральная;

серин: (Ser, S) полярная, нейтральная;

треонин: (Thr, T) полярная, нейтральная;

триптофан: (Trp, W) неполярная, нейтральная;

тирозин: (Tyr, Y) полярная, нейтральная;

валин: (Val, V) неполярная, нейтральная; и

гистидин: (His, H) полярная, положительная (10%), нейтральная (90%).

"Положительно" заряженные аминокислоты:

аргинин: (Arg, R) полярная, положительная; и

лизин: (Lys, L) полярная, положительная.

"Отрицательно" заряженные аминокислот:

аспарагиновая кислота: (Asp, D) полярная, отрицательная; и

глутаминовая кислота: (Glu, E) полярная, отрицательная.

"Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей" в отношении последовательности антител и гомологов, описанных в настоящем документе, определяют как процентное содержание аминокислотных остатков в последовательностях-кандидатах, которые идентичны аминокислотным остаткам в специфической полипептидной последовательности, после выравнивания последовательности и, при необходимости, введения пробелов для достижения максимального процента идентичности последовательности и, не считая любые консервативные замены частью идентичности последовательности. Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивание по всей длине сравниваемых последовательностей.

Вариант антитела специфически понимают как включающий гомологи, аналоги, фрагменты, модификации или варианты со специфическим образцом гликозилирования, например, полученные с помощью гликоконструирования, которые функциональны и могут служить в качестве функциональных эквивалентов, например, связывания со специфическими мишенями и с функциональными свойствами.

Антитело, описанное в настоящем документе, может демонстрировать или может не демонстрировать эффекторную функцию Fc. Хотя способ действия главным образом опосредуется нейтрализацией антител без эффекторных функций Fc, Fc может рекрутировать комплемент и способствовать устранению антигена-мишени, такому как токсин, кровотока путем образования иммунных комплексов.

Специфические антитела могут быть лишены активного Fc-фрагмента, таким образом, или составлять домены антител, которые не содержат Fc-часть антитела или, которые не содержат сайт связывания рецептора FcraMMa, или, включающий домены антител, утративших эффекторную функция Fc, например, путем модификации для уменьшения эффекторных функций Fc, в особенности, для отмены или снижения активности ADCC и/или CDC. Альтернативные антитела могут быть сконструированы для включения модификаций, увеличивающих эффекторные функции Fc, в особенности, для усиления активности ADCC и/или CDC.

Термин "Fc-фрагмент" или "Fc-области", как применен в настоящем документе, должен конкретно включать те мутанты или функционально активные варианты с дефектными Fc-рецептор-связывающими свойствами, например, Fc-области, полученные способами гликоинженерии, или обладающие сниженной эффекторной функцией и/или продленным временем полужизни.

Термин "эффекторная функция", как применен в настоящем документе, должен означать эффект, опосредуемый связыванием эффекторного лиганда с Fc-областью антитела. Иллюстративные эффекторные лиганды представляют собой Fc-рецепторы или Fc-рецептор-подобные молекулы, связывающиеся с иммуноглобулинами. Fc-рецептор представляет собой белок, обнаруженный на поверхности определенных клеток, включая природные клетки-киллеры, макрофаги, нейтрофилы и тучные клетки, которые вносят вклад в защитные функции иммунной системы. Существует несколько других типов Fc-рецепторов, которые классифицируют на основании на типа антител, которые они узнают; рецепторы, которые связывают самый распространенный класс антител, IgG, называются Fc-гамма рецепторами (FcγR или FcgR). Семейство FcγRs включает несколько членов: FcγRI (CD64) FcγRIIA (CD32a) FcγRIIB (CD32b) FcγRIIIA (CD16a) FcγRIIIB (CD16b). Среди эффекторных молекул существуют также белки системы комплемента, такие как Clq.

Другой Fc-рецептор, неонатальный Fc-рецептор (FcRn), также связывает IgG и вовлечен в сохранение и время полужизни данного антитела. В соответствии с изобретением, предпочтительно, чтобы функция, опосредуемая FcRn, не представляла собой отрицательной модуляции.

Термин "отрицательная модуляция" относится к снижению эффекта, опосредуемого геном или группой генов, или полипептидом, путем генной мутации или отрицательной регуляции генной экспрессии или активности продуктов генной экспрессии, таких как нуклеиновые кислоты или полипептиды, конкретно, путем снижения связывающих свойств, таких как сродство, авидность или специфичность, включая ингибирование связывания лиганда, такого как эффекторный лиганд, по меньшей мере, частично. Таким образом, может быть получено антитело, демонстрирующее сниженные ADCC и/или CDC.

Антитело-зависимая опосредуемая клетками цитотоксичность (ADCC) убивает покрытые антителами клетки-мишени с помощью клеток с Fc-рецепторами, которые узнают константную область связанного антитела. Большинство ADCC опосредуется NK-клетками, которые имеют Fc-рецептор FcγRIII или CD16 на своей поверхности. В типичных анализах применяют клетки-мишени, такие как клетки Ramos, которые инкубируют с последовательно разбавленными антителами перед добавлением из недавно изолированных эффекторных клеток. Пробу ADCC затем дополнительно инкубируют в течение нескольких часов и регистрируют % цитотоксичности. Обычно отношение мишень:эффектор равно примерно 1:16, но может быть равно 1:1 вплоть до 1:50.

Комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC) представляет собой механизм уничтожения клетки, в котором антитело, связанное с мишенью клеточной поверхности, фиксирует комплемент, что приводит к сборке мембраноатакующего комплекса, который пробивает отверстия в мембране целевой клетки, что приводит в результате к последующему лизису клеток. Обычно применяемый анализ CDC следует такой же процедуре, как для определения ADCC, однако с комплементом, содержащим сыворотку вместо эф-

фекторной клетки.

Антитело, описанное в настоящем документе, имеет Fc-область, дефицитную в опосредовании эффекторных функций, предпочтительно, отрицательную модуляцию цитотоксической активности как определено по любому из анализов ADCC и CDC, предпочтительно, в целях обеспечения значительного снижения в процентной доли цитолиза по сравнению с контролем. Абсолютное снижение процентной доли, предпочтительно, было выше, чем 10%, более предпочтительно выше, чем 20%, даже более предпочтительно, выше, чем 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. Наиболее предпочтительное антитело, в основном, свободно, по меньшей мере, от одной из активностей ADCC или CDC, например, имеет менее чем 10% от типичной ADCC и/или CDC активности по сравнению с нативным (немодифицированным) антителом. Термин "в основном свободно", как применен в настоящем документе, должен также относиться к тем вариантам антител, который полностью утратили такую активность, как измерено в стандартном анализе.

В данной области техники хорошо известно, что специфические точечные мутации в рамках Fc-области эффективно отрицательно модулируют эффекторную функцию. Конкретно, предпочтительные мутации применяют в области сайта связывания на человеческом IgG для других Fcгамма-рецепторов (FcgR), которые могут обеспечить отмену иммунного рекрутинга через FcgR. Сайт связывания на человеческом и мышином IgG для FcgR был нанесен в первую очередь на нижнюю шарнирную область, состоящую из остатков IgG 233-239. Дополнительные широкие сегменты, например, Gly316-Lys338 определяли для человеческого FcγRI, Lys274-Arg301 и Tyr407-Arg416 для человеческого FcγRIII. Кристаллическая структура с разрешением 3,2Å человеческого Fc-фрагмента IgG1 с человеческим RIIIA Fcгамма дает представление об остатках Leu234-Ser239IgG1, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299 и Ala327-Ile332 как о вовлеченных в связывание с FcγRIIIA. Обзор, относящийся к отображению с высоким разрешением человеческого IgG1 для человеческих FcγR-рецепторов (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIIA), был обеспечен в Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604).

Антитело или Fc-область могут быть гликозилированными или негликозилированными, в зависимости от специфических мутаций или выбора системы экспрессии, или сконструированными способами гликоинженерии для получения специфических образцов гликозилирования.

Термин "сконструированными способами гликоинженерии" в отношении последовательности антител или Fc-области должен относиться к вариантам гликозилирования, имеющим модифицированную ADCC и/или CDC в результате конструирования способами гликоинженерии. Все антитела содержат углеводные структуры в консервативных положениях в тяжелой цепи константных областей, с каждым изотипом, имеющим отдельный набор N-соединенных углеводных структур, который переменным образом влияют на сборку, секрецию или функциональную активность белка. Тип антитела IgG1 представляет собой гликобелки, которые имеют консервативный N-соединенный сайт гликозилирования на Asn297 в каждом CH2-домене. Два сложных двухантенных олигосахарида, присоединенных к Asn297, заглублены между CH2-доменами, образуя обширные контакты с остовом полипептида, и их присутствие имеет важное значение для антитела с опосредуемыми эффекторными функциями, такими как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) (Lifely et al., 1995, Glycobiology 5: 813-822). Удаление N-гликана в N297, например, через мутирование N297, например, до A или T299, как правило, приводит к негликозилированному Fc со сниженной ADCC.

Основные различия в гликозилировании антител имеют место между клеточными линиями, и даже незначительные различия наблюдаются для данной клеточной линии, выращенной в других условия культивирования. Экспрессия в бактериальных клетках, как правило, обеспечивает негликозилированное антитело, которое в основном свободно от активности ADCC и/или CDC. Было сообщено, что клетки CHO с тетрациклин-регулируемой экспрессией β(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII), гликозилтрансферазой, катализирующей образование GIcNAc с точками ветвления, имеют улучшенную активность ADCC (Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17:176-180). В дополнение к выбору клеток-хозяев, факторы, которые влияют на гликозилирование в ходе рекомбинантного получения антител, включают режим роста, состав среды, плотность культуры, оксигенацию, pH, схемы очистки и тому подобное.

Термин "сайта связывания антигена" или "сайт связывания" относится к части антитела, которая участвует в связывании антигена. Сайт связывания антигена образуется аминокислотными остатками N-концевых вариабельных ("V") областей тяжелых ("H") и/или легких ("L") цепей, или их вариабельных доменов. Три сильно расходящиеся участка в пределах V-областей тяжелых и легких цепей, называемые "гипервариабельные области", расположены между более консервативными фланкирующими участками, известными как каркасные области. Антигенсвязывающий сайт обеспечивает поверхность, которая комплементарна трехмерной поверхности связанного эпитопа или антигена, и гипервариабельные области называют "определяющими комплементарность областями", или "CDR". Сайт связывания, включенный в CDR, в настоящем документе также называют "сайтом связывания CDR".

Термин "антиген", как применен в настоящем документе, взаимозаменяем с терминами "мишень" или "антиген-мишень" и должен относиться к полной молекуле-мишени или к фрагменту такой молекулы, узнаваемой сайтом связывания антитела. Конкретно, субструктуры антигена, например, полипептид

или углеводная структура, обычно называемые "эпитопы", например, эпитопы B-клеток или эпитоп T-клетки, которые иммунологически релевантны, могут узнаваться таким сайтом связывания. Антиген huTNFR1 представляет собой антиген, включающий структуры рецептора, которые способны специфически связываться с тримерным TNF или LTα в виде моно-или мультимерного рецептора цитокина на поверхности большинства человеческих клеток.

Термин "huTNFR1", как применен в настоящем документе, должен относиться к CD120a TNFR1 (p55/60, суперсемейство рецептора фактора некроза опухоли TNFRSF1A, член 1A [Homo sapiens (человеческий)], ген ID: 7132) рецептор TNF, экспрессируется повсеместно в большинстве клеток человека.

Термин "эпитоп", как применен в настоящем документе, должен, в особенности, относится к молекулярной структуре, которая может полностью составлять сайт связывания антитела, представляющего собой партнера специфического связывания или быть частью партнера специфического связывания. Эпитоп может состоять из углеводов, пептидной структуры, жирной кислоты, органического, биохимического или неорганических вещества или их производных и любой их комбинации. Если эпитоп включен в пептидную структуру, такую как пептид, полипептид или белок, он обычно включает, по меньшей мере, 3 аминокислоты, предпочтительно, от 5 до 40 аминокислот и более предпочтительно, между примерно 10-20 аминокислотами. Эпитопы могут быть или линейными, или конформационными эпитопами. Линейный эпитоп включает один сегмент первичной последовательности полипептидной или углеводной цепи. Линейные эпитопы могут быть смежными или перекрывающимися.

Конформационные эпитопы состоят из аминокислот или углеводов, собранных вместе в результате сворачивания полипептида при образовании третичной структуры, и аминокислоты не обязательно примыкают к друг к другу в линейной последовательности. Конкретно, и в отношении полипептидных антигенов, конформационный или прерывистый эпитоп характеризуется присутствием двух или более дискретных аминокислотных остатков, разделенных в первичной последовательности, но собранных в последовательную структуру на поверхности молекулы, когда полипептид сворачивается в нативный белок/антиген.

В настоящем документе термин "эпитоп" должен, в особенности, относится к эпитопу, узнаваемому ATROSAB, который представляет собой эпитоп, который включает или содержит, в основном, по меньшей мере, мембрано-дистальный CRD1 и субдомен A1 из CDR2 из huTNFR1.

Термин "экспрессия" понимают следующим образом. Молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие желаемую кодирующую последовательность продукта экспрессии, такого, например, как антитело, как описано в настоящем документе, и контрольные последовательности, такие, например, как промотор в функциональной связи, могут быть применены для целей экспрессии. Хозяева, трансформированные или трансфицированные такими последовательностями, способны продуцировать кодируемые белки. С целью влияния на преобразования, система экспрессии может быть включена в вектор; однако релевантная ДНК также может быть интегрирована в хромосому хозяина. Конкретно, термин относится к клетке-хозяину и совместимому вектору в подходящих условиях, например, для экспрессии белка, кодируемого чужеродной ДНК, которую несет вектор и которую ввели в клетку-хозяина.

Кодирующая ДНК представляет собой последовательность ДНК, которая кодирует определенную аминокислотную последовательность для определенного полипептида или белка, такого, например, как антитело. Промотор ДНК представляет собой последовательность ДНК, которая инициирует, регулирует или иным образом опосредует или контролирует экспрессию кодирующей ДНК. Промотор ДНК и кодирующая ДНК могут быть из одного и того же гена или из другого гена и могут быть из одних и тех же организмов или других организмов. Рекомбинантные клонирующие векторы часто включают одну или несколько систем репликации для клонирования или экспрессии, одного или нескольких маркеров для отбора в хозяине, например, на устойчивость к антибиотикам, и одну или несколько экспрессионных кассет.

"Векторы", примененные в настоящем документе, определяют как последовательности ДНК, которые необходимы для транскрипции клонированных рекомбинантных нуклеотидных последовательностей, т.е. рекомбинантных генов и трансляции их мРНК в подходящем организме-хозяине.

Термин "экспрессионная кассета" относится к кодирующей последовательности ДНК или сегменту ДНК, который кодирует продукт экспрессии, который может быть вставлен в вектор в определенных сайтах рестрикции. Сайты рестрикции кассеты предназначены для обеспечения вставки кассеты в правильную рамку считывания. В целом, чужеродную ДНК встраивают в один или несколько сайтов рестрикции векторной ДНК и затем переносят с помощью вектора в клетку-хозяина вместе с передаваемой векторной ДНК. Сегмент или последовательность ДНК, имеющие вставленную или добавленную ДНК, такую как вектор экспрессии, также могут быть названы "конструкция ДНК".

Векторы экспрессии включают экспрессионную кассету и обычно дополнительно включают источник для автономной репликации в клетках-хозяевах или сайт интеграции генома, один или несколько селективных маркеров (например, ген синтеза аминокислоты или ген, придающий устойчивость к антибиотикам, таким как зеоцин, канамицин, G418 или гигромицин), ряд сайтов расщепления рестрикционными ферментами, подходящую промоторную последовательность и терминатор транскрипции, данные компоненты функционально связаны друг с другом. Термин "вектор", как применен в настоящем доку-

менте, включает автономно реплицирующиеся нуклеотидные последовательности, а также нуклеотидные последовательности, интегрированные в геном. Обычный тип вектора представляет собой "плазмиду", которая, в целом, представляет собой автономную молекулу двухцепочечной ДНК, которая может легко принять дополнительные (чужеродные) ДНК и, которая легко может быть введена в подходящую клетку-хозяина. Плазмидный вектор часто содержит кодирующую ДНК и промоторную ДНК и имеет один или нескольких сайтов рестрикции, подходящих для вставки чужеродной ДНК. Конкретно, термин "вектор" или "плазмида" относится к носителю, с помощью которого последовательность ДНК или РНК (например, чужеродный ген) может быть введен в клетку-хозяина, с тем, чтобы трансформировать хозяина и стимулировать экспрессию (например, транскрипцию и трансляцию) введенной последовательности.

Термин "клетка-хозяин", как применен в настоящем документе, должен относиться к первичному субъекту, к клетке, трансформированной для продукции определенного рекомбинантного белка, такого как антитело, как описано в настоящем документе, и любой его потомства. Следует понимать, что не все потомство в точности идентично родительской клетке (из-за преднамеренных или непреднамеренных мутаций или различий в окружающей среде), однако такое измененное потомство включают в данные термины, до тех пор, пока потомство сохраняется такую же функциональность, как та, что была в исходно трансформированной клетке. Термин "линия клеток-хозяев" относится к клеточной линии клеток-хозяев, как применена для экспрессии рекомбинантного гена для получения рекомбинантных полипептидов, таких как рекомбинантные антитела. Термин "клеточная линия", как применен в настоящем документе, относится к установленному клону определенного типа клеток, который имеет приобретенную способность к пролиферации в течение длительного периода времени. Такая клетка-хозяин или линия клеток-хозяев может поддерживаться в клеточной культуре и/или культивироваться для получения рекомбинантного полипептида.

Термин "изолированный" или "выделение", как применен в настоящем документе, в отношении нуклеиновой кислоты, антитела или другого соединения, должен относиться к такому соединению, которое в достаточной степени было отделено от окружающей среды, с которой оно было связано в природных условиях, таким образом, существует "в значительной степени очищенной" форме. "Изолированный" не обязательно означает исключение искусственных или синтетических смесей с другими соединениями или материалами, или присутствие примесей, которые не мешают фундаментальной активности и который могут иметь место, например, в результате неполной очистки. В особенности, изолированные молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения также подразумевают включение нуклеиновых кислот, которые не представляют собой природные нуклеиновые кислоты, например, кодон-оптимизированные нуклеиновые кислоты или кДНК, или химически синтезированные.

Подобным образом, изолированное антитело, как описано далее в настоящем документе, представляет собой конкретно неприродное антитело, например, как обеспеченное в комбинационном препарате с другим антителом или активным агентом, комбинация которых не встречается в природе, или как производное или вариант природного антитела, или оптимизированный или с созревшим сродством вариант природного антитела, или антитело с каркасной областью, которая была сконструирована для улучшения стабильности антитела. Благодаря такой оптимизации или конструированию антитело включает одну или нескольких синтетических структур или последовательностей или характеристик, которые не будут найдены в контексте антитела в природе.

В отношении нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе, иногда применяют термин "изолированная нуклеиновая кислота". Этот термин, когда применяется к ДНК, относится к молекуле ДНК, которая отделена от последовательности, с которой она непосредственно соприкасается в природном геноме организма, из которого она происходит. Например, "изолированная нуклеиновая кислота" может включать молекулу ДНК, вставленную в вектор, такой как плазмида или вирусный вектор, или интегрированную в геномную ДНК прокариотической или эукариотической клетки или организма-хозяина. Применительно к РНК, термин "изолированная нуклеиновая кислота" относится в первую очередь к молекуле РНК, кодируемой изолированной молекулой ДНК, как определена выше. Альтернативно, термин может относиться к молекуле РНК, которая были в достаточной степени отделена от других нуклеиновых кислот, с которыми она могла быть связана в природном состоянии (т.е. в клетках или тканях). "Изолированная нуклеиновая кислота" (или ДНК, или РНК) может дополнительно представлять собой молекулу, полученную непосредственно биологическими или синтетическими способами и отделенную от других компонентов, присутствовавших при ее производстве.

В отношении полипептидов или белков, таких как изолированные антитела, описанные в настоящем документе, термин "изолированный" будет конкретно относиться к соединениям, который свободны или в значительной степени свободны от материала, с которым они могли быть связаны в природе, таким как другие соединения, с которыми их обнаруживают в их природном окружении, или в окружении, в котором их получали (например, клеточная культура), когда такой препарат получают с помощью технологии рекомбинантных ДНК, практикуемых in vitro или in vivo. Изолированные соединения могут быть составлены с разбавителями или вспомогательными средствами и все еще для практических целей могут быть изолированными, например, полипептиды или полинуклеотиды могут быть смешаны с фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными средствами при применении в диагностике

или терапии.

Термин "рекомбинантный", как применен в настоящем документе, должен означать "полученный с помощью или в результате генной инженерии". Рекомбинантный хозяин специфически включает вектор экспрессии или клонирующий вектор, или он генетически сконструирован так, что содержит последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, в особенности, с применением нуклеотидной последовательности, чужеродной хозяину. Рекомбинантный белок получают экспрессией соответствующей рекомбинантной нуклеиновой кислоты в хозяине.

Конструкция антитела, описанная далее в настоящем документе, может представлять собой рекомбинантное антитело. С этой целью, термин "рекомбинантное антитело", как применен в настоящем документе, включает антитела, который были получены, экспрессированы, созданы или изолированы рекомбинантными способами, такими как (a) антитела изолировали из животного (например, из мыши), которое представляло собой трансгенное или трансхромосомное животное для генов человеческого иммуноглобулина или полученной из него гибридомы, (b) антитела изолировали из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела изолировали из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных человеческих антител или библиотеки антигенсвязывающих последовательностей антител и (d) антитела, которые были получены, экспрессированы, созданы или изолированы другими способами, в которые был вовлечен сплайсинг последовательности гена человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела включают антитела, сконструированные для включения перестроек и мутаций, которые произошли, например, при созревании антитела. В соответствии с настоящим изобретением могут быть применены общепринятые молекулярно-биологические, микробиологические технологии и технологии рекомбинантной ДНК в рамках компетентности специалистов в данной области техники. Такие технологии подробно описаны в литературе. Смотри, например, Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1982).

Антитело, описанное в настоящем документе, предпочтительно обеспечивают в виде рекомбинантного белка, полученного с помощью рекомбинантной системы экспрессии с применением клетки-хозяина, например, экспрессией в периплазматическом пространстве E. coli или экспрессией в виде секретируемого белка в эукариотической системе экспрессии, такой как дрожжи или млекопитающие, например, с помощью линий продуцирующих клеток-хозяев CHO, HEK или человека.

Клетки яичника китайского хомячка (CHO) наиболее часто применяют для продукции антител. В дополнение к обеспечению подходящими образцами гликозилирования, данные клетки обеспечивают постоянную генерацию генетически стабильных, высокопродуктивных клоновых линий клеток. Они могут быть культивированы до высокой плотности в простых биореакторах с помощью свободной от сыворотки среды и позволяют разрабатывать безопасные и воспроизводимые биопроцессы.

Клетки-хозяева наиболее предпочтительны, когда их создают, адаптируют и полностью культивируют в свободных от сыворотки условиях и необязательно в средах, которые свободны от какого-либо белка/пептида животного происхождения.

Термин "специфическое" связывание, узнавание или нацеливание, как применен в настоящем документе, означает, что участник реакции связывания, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, демонстрирует заметную аффинность для антигена-мишени или соответствующего эпитопа в гетерогенной популяции молекул. Таким образом, в назначенных условиях (например, иммуноанализ) участник реакции связывания конкретно связывается с антигеном-мишенью и не связывается в значительном количестве с другими молекулами, присутствующими в образце. Специфическое связывание означает, что связывание селективно в терминах идентичности, высокой, умеренной или низкой аффинности связывания или авидности мишени, как отобрано. Селективного связывания обычно достигают, если константа связывания или динамика связывания, по меньшей мере, в 10 раз отличается (понимают как, по меньшей мере, 1 log различия), предпочтительно, по меньшей мере, в 100 раз отличается (понимают как, по меньшей мере, 2 logs различие) и более предпочтительно, по меньшей мере, в 1000 раз отличается (понимают как, по меньшей мере, 3 logs различие) по сравнению с другой мишенью. Дифференциальное связывание может быть определено с помощью иммуноанализа, предпочтительно, иммуноблоттинга, ELISA или другими иммунологическими способами. Специфичность молекулы антитела для определенной мишени можно определить конкурентными анализами, например, как описано в руководстве Harlow, et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988. Селективное связывание может быть сконструировано или улучшено с помощью рекомбинантных способов оптимизации антитела, известных в данной области техники. Например, определенные участки вариабельных областей цепей иммуноглобулина, описанные в настоящем документе, могут быть подвергнуты одной или нескольким стратегии оптимизация, включая перетасовку легкой цепи, направленного мутагенеза, амальгамирования CDR и направленного мутагенеза отобранных CDR и/или каркасных областей.

Ингибитор, описанный в настоящем документе, специфически включает антитело, которое имеет такую же специфичность, или такой же антигенсвязывающий сайт, как определено специфической CDR-последовательностью (SEQ ID NO: 1-6 или ее функциональные CDR-варианты) для связывания мишени

TNFR1, или связывает такой же эпитоп или перекрывающиеся эпитопы как H398 или ATROSAB.

Применение термина "имеющие такую же специфичность", "имеющие такой же сайт связывания" или "связывающие такой же эпитоп" указывает на такой эквивалент моноклонального антитела, который демонстрирует такие же или в основном такие же, т.е. сходные, характеристики иммунореактивности (связывания) и конкурирует за связывание с предварительно выбранной целевой связывающей последовательностью. Относительная специфичность молекулы антитела к определенной мишени может быть относительно определена конкурентными анализами, например, как описано в руководстве Harlow, et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.

Конкуренция в настоящем документе означает более сильное относительное ингибирование, по сравнению с примерно 30%, как определено по конкуренции в анализе ELISA или в анализе ForteBio. Может быть желательно установить более высокий порог относительного ингибирования в качестве критериев того, что представляет собой подходящий уровень конкуренции в определенном контексте, например, если конкурентный анализ применяют для отбора или скрининга на новые антитела, разрабатываемые с намеченными функциями связывания антигена. Таким образом, например, можно установить критерии для конкурентного связывания, в которых обнаруживают, по меньшей мере, 40% относительного ингибирования, или по меньшей мере 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или даже, по меньшей мере, 100%, перед тем, как антитело будет считаться достаточно конкурентным.

Термин "субъект", как применен в настоящем документе, должен относиться к теплокровным млекопитающим, в особенности, к человеку или к животному, не представляющему собой человека. В особенности, медицинское применение, описанное в настоящем документе, или соответствующий способ лечения применяют к субъекту, нуждающегося в профилактике или лечении состояния заболевания, связанного с воспалением. Субъект может представлять собой пациента, находящегося в группе риска или страдающего от воспалительных заболеваний, включая раннюю стадию или позднюю стадию заболевания. Термин "пациент" включает человека и других субъектов млекопитающих, которые получают либо профилактическое, или терапевтическое лечение. Термин "лечение", следовательно, подразумевает включение как профилактического, так и терапевтического лечения.

Субъекта, например, лечат для профилактики или терапии воспалительных состояний заболевания. В особенности, лечат субъекта, который или находится в группе риска острого или хронического воспалительного заболевания или развития такого заболевания или рецидива заболевания, или субъекта, страдающего от такого воспалительного заболевания.

Конкретно, термин "терапия" относится к терапевтическим мерам, которые предназначены для охвата введения для лечения заболевания или снижения симптомов заболевания.

Конкретно, термин "профилактика" относится к предупредительным мерам, который предназначены для уменьшения риска наступления заболеваний или рецидива заболеваний.

Ингибитор, описанный в настоящем документе, может специфически регулировать выживаемость клеток путем ингибирования взаимодействия TNF-TNFR1, предотвращая активацию сигнальных путей, находящихся после TNFR, таким образом, минимизируя провоспалительную программу, он будет инициировать в иммунных клетках и снижать патологию аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Благодаря способности ингибитора предупреждать взаимодействие TNFR1 с его лигандом TNF, будет происходить снижение экспансии и выживаемости популяций патогенных клеток и снижение продукции провоспалительных цитокинов и ослабления TNF-опосредованного воспаления. В контексте аутоиммунных заболеваний, взаимодействия TNF-TNFR происходят, главным образом, во время иммунного ответа. Функции специфических типов иммунных клеток контролируются взаимодействиями TNF-TNFR и могут регулироваться ингибитором, как описан в настоящем документе.

Среди воспалительных заболеваний есть указания на анти-TNF терапевтические средства. Таким образом, ингибитор или антитело, описанное в настоящем документе, применяют в качестве альтернативы общепринятым анти-TNF терапевтическим средствам.

Конкретно, фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, подходит для лечения любого из следующих заболеваний или связанных с ними воспалительных состояний (или воспалительных заболеваний), данные заболевания выбирают из группы, состоящей из аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита, ювенильного артрита, анкилозирующего спондилита, болезни Крона (Morbus Crohn), рассеянного склероза, застойной сердечной недостаточности, метаболических заболеваний, синдрома выброса цитокинов, септического шока, острого и хронического нейродегенеративного заболевания, включая инсульт, болезни Альцгеймера и Паркинсона. Дополнительно соответствующие показания включают язвенный колит, панкреатит, ХОБЛ и другие хронические воспалительные и/или аутоиммунные заболевания, острые молниеносные вирусные или бактериальные инфекции, заболевания обмена веществ, хронические нейродегенеративные заболевания, генетически унаследованные заболевания с TNF/TNFR1 в качестве причинного патологического медиатора, предпочтительно, выбранные из синдра периодической лихорадки и херувизма и рака.

Термин "терапевтически эффективное количество", примененный в настоящем документе взаимо-

заменяемо с любым из терминов "эффективное количество" или "достаточное количество" соединения, например, антитела, описанного в настоящем документе, представляет собой количество или активность, достаточные, при введении субъекту, для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты, и, в качестве таковых, эффективное количестве или его синоним зависит от контекста, в который оно применяется.

Эффективное количество предназначено для обозначения, такого количества соединения, которого достаточно для лечения, профилактики или ингибирования такого заболевания или нарушения. В контексте заболеваний, терапевтически эффективные количества антитела, как описано в настоящем документе, конкретно применяют для лечения, модулировать, ослабления, обращения или воздействия на заболевание или состояния, которые выигрывают от ингибирования взаимодействия TNF-TNFR1.

Количество соединения, которое будет соответствовать такому эффективному количеству, будет варьировать в зависимости от различных факторов, таких как данный лекарственный препарат или соединение, фармацевтическая композиция, путь введения, тип заболевания или нарушения, идентичность субъекта или хозяина, подвергаемого лечению, и им подобные, но, тем не менее, может быть установлено специалистом в данной области техники.

Предпочтительная фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, включает терапевтически эффективное количество антитела huTNFR1, как определено выше, и необязательно один или нескольких дополнительных компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемого носителя, фармацевтически приемлемых солей, вспомогательного средства, стабилизатора, разбавителя и растворителя, или их любой комбинации.

В соответствии с изобретением способ лечения пациента включает стадию введения терапевтически эффективного количества определенных выше huTNFR1-антител нуждающемуся в этом пациенту. Терапевтически эффективное количество, как правило, находится в диапазоне 0,5-500 мг, предпочтительно, 1-400 мг, даже более предпочтительно, вплоть до 300 мг, вплоть до 200 мг, вплоть до 100 мг или вплоть до 10 мг, хотя более высокие дозы могут быть показаны, например, для лечения острых состояний заболевания.

В одном из воплощений, антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой только терапевтически активное средство, введенное пациенту. Альтернативно, антитело, описанное в настоящем документе, вводят в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, включая без ограничений антагонистов TNF, противовоспалительные средства, цитокины, факторы роста или другие терапевтические средства. TNFR1-антагоническое антитело может быть введено одновременно или последовательно с одним или несколькими другими терапевтическими схемами, предпочтительно с анти-TNF терапевтическими средствами, такими как анти-TNF антитела. Антитело, описанное в настоящем документе, предпочтительно вводят пациенту в качестве терапии первой линии, или в качестве терапии второй линии, если анти-TNF терапевтические средства не были эффективными, или как неотложное, или как длительное лечение. Конкретно предпочтительное медицинское применение - для лечения хронических заболеваний.

Кроме того, схема лечения или профилактики субъекта терапевтически эффективным количеством антитела, описанная в настоящем документе, может состоять из единственного введения, или альтернативно включать серию применений. Например, антитело может быть введено, по меньшей мере один раз в год, по меньшей мере, раз в полгода или, по меньшей мере, раз в месяц. Однако в другом воплощении, антитело может быть введено субъекту от примерно одного раза в неделю до примерно ежедневного введения для данного лечения. Длительность периода лечения зависит от целого ряда факторов, таких как тяжесть заболевания, острое или хроническое заболевание, возраст пациента, формат концентрации и активности антител. Следует также принять во внимание, что эффективную дозировку, применяемую для лечения или профилактики можно увеличивать или снижать в течение курса определенной схемы лечения или профилактики. Изменения в дозировке давать результат и будут очевидны с помощью стандартных диагностических анализов, известных в данной области техники. В некоторых случаях может быть необходимо долговременное введение.

После того как антитела с желаемыми связывающими свойствами были идентифицированы, такие антитела, включая фрагменты антител, могут быть получены с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, включая, например, гибридомные технологии или технологию рекомбинантных ДНК.

Рекомбинантные моноклональные антитела, например, могут быть получены с помощью выделения ДНК, кодирующей требуемые цепи антитела, и трансфекции в рекомбинантную клетку-хозяина, кодирующей последовательности для экспрессии, с помощью хорошо известных рекомбинантных векторов экспрессии, например, плазмид, описанных в настоящем документе, или экспрессионной кассеты(экспрессионных кассет), включающей(включающих) нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательности антитела. Рекомбинантные клетки-хозяева могут представлять собой прокариотические и эукариотические клетки, такие как описаны выше.

В соответствии со специфическим аспектом, нуклеотидные последовательности могут быть применены для генетической манипуляции с гуманизированным антителом или для улучшения сродства, или

других характеристик антитела. Например, константная область может быть сконструирована так, чтобы в большей степени напоминать человеческие константные области, чтобы избежать иммунного ответа, если антитело применяют в клинических испытаниях и лечении у людей. Может быть желательно генетически манипулировать с последовательностью антител для получения более высокой аффинности к мишени. Специалисту в данной области техники будет понятно, что изменения в одном или нескольких полинуклеотидах могут быть сделаны на антителе, и все еще сохранится его способность к связыванию с антигеном-мишенью.

Получение молекул антитела различными способами в целом хорошо понятно. Патент США 6331415 (Cabilly et al.), например, описывает способ получения рекомбинантных антител, в котором тяжелые и легкие цепи экспрессируют одновременно из единственного вектора или из двух отдельных векторов в единственной клетке. Wibbenmeyer et al. (1999, Biochim Biophys Acta 1430:191-202) и Lee и Kwak (2003, J. Biotechnology 101:189-198) описали получение моноклональных антител из полученных по отдельности тяжелых и легких цепей, с помощью плазмид, экспрессируемых в отдельных культурах клеток-хозяев. Различные другие технологии, имеющие отношение к получению антител обеспечены, например, в руководстве Harlow, et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988).

В соответствии со специфическим аспектом, антитело, описанное в настоящем документе, может быть секвенировано, и затем полинуклеотидная последовательность может быть клонирована в вектор для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующая антитело, может поддерживаться в векторе в клетке-хозяине, и затем клетка-хозяин может быть размножена и заморожена для дальнейшего применения. Получение рекомбинантных моноклональных антител в клеточной культуре может быть выполнено через клонирование генов антитела из В-клеток с помощью способов, известных в данной области техники.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает изолированную нуклеиновую кислоту, включающую кодирующую последовательность для получения рекомбинантного антитела, описанного в настоящем документе.

Антитело, кодирующее нуклеиновую кислоту, может иметь любые подходящие характеристики и включать любые подходящие признаки или их комбинации. Таким образом, например, кодирующая антитело нуклеиновая кислота, в форме ДНК, РНК или их гибрида, может включать неприродные основания и модифицированную основу, например, фосфоротиоатную основу, которая способствует стабильности нуклеиновой кислоты, или и то и другое. Предпочтительно, нуклеиновая кислота может представлять собой кодон-оптимизированную последовательность. Нуклеиновая кислота предпочтительно может быть включена в экспрессионную кассету, вектор или плазмиду, описанную в настоящем документе, включающую признаки, которые стимулируют желаемые экспрессию, репликацию и/или отбор в целевой клетке-хозяине(целевых клетках-хозяевах). Примеры таких признаков включают происхождение компонента репликации, компонента отбора гена, компонента промотора, компонента элемента энхансера, компонента полиаденилирования последовательности, компонента терминации и им подобные, множество подходящих примеров которых известны.

В настоящем раскрытии дополнительно обеспечивают конструкции рекомбинантной ДНК, включающие одну или нескольких нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе. Данные рекомбинантные конструкции применяют связанными с вектором, таким как плазмида, фагмида, фаг или вирусный вектор, в которые вставляют молекулу ДНК, кодирующую любое раскрытое антитело.

Моноклональные антитела получают любым способом, с помощью которого производят молекулы антитела в линиях клеток в культуре, например, культивируя рекомбинантные эукариотические (млекопитающих или насекомых) или прокариотические (бактериальные) клетки-хозяева. Примеры подходящих способов получения моноклональных антител, включают гибридомные способы по Köhler & Milstein (1975, Nature 256:495-497) и гибридомный способ с человеческими В-клетками (Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001; and Brodeur et al., 1987, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, (Marcel Dekker, Inc., New York), pp. 51-63).

Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть идентифицированы или получены с применением гибридомного способа. В таком способе, мышь или другое соответствующее животное-хозяин, такое как хомяк, иммунизируют для получения лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком, примененном для иммунизации. Альтернативно, лимфоциты могут быть иммунизированы in vitro. Лимфоциты затем сливают с клетками миеломы с помощью подходящего фактор, вызывающего слияние клеток, такого как полиэтиленгликоль, для формирования гибридомной клетки.

Культуральную среду, в которой растят гибридомные клетки, анализируют для получения моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно, специфичность связывания моноклональных антител, полученных с помощью гибридомной клетки, определяют иммунопреципитацией или в in vitro анализе связывания, таком как радиоиммуноанализ (RIA) или ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA).

Моноклональные антитела (mAbs) затем могут быть очищены от гибридомных супернатантов для

дополнительного тестирования на специфическое связывание с их антигеном-мишенью и для конструирования антител, например, для других диагностических или терапевтических целей.

huTNFR1-специфические антитела, в некоторых случаях, возникают путем скрининга против антигена huTNFR1. Для увеличения вероятности выделения дифференциально связывающих клонов можно применить множественное селективное давление путем поступательного скрининга против других антигенов или эпитопов.

Способы скрининг для идентификации антитела с желаемыми селективными связывающими свойствами могут быть выполнены технологиями дисплеев с помощью библиотеки, отображающей последовательности антител или их антигенсвязывающие последовательности (например, с помощью фага, бактериальных, дрожжевых клеток или клеток млекопитающих; или in vitro системы дисплеев, транслирующих информацию нуклеиновой кислоты в соответствующие (поли)пептиды). Реактивность может быть оценена способами, основанными на ELISA, Вестерн-блоттинге или поверхностном окрашивании с проточной цитометрией, например, с помощью стандартных анализов.

Изолированный антиген(изолированные антигены) может(могут) например, быть применен(применены) для отбора антитела из библиотеки антител, например, фаговый, фагмидный или дрожжевой дисплей библиотеки антител.

Изобретение, кроме того, обеспечивает фармацевтическую композицию, которая включает ингибитор или антитело, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Данная фармацевтическая композиция может быть введена в соответствии с настоящим изобретение в виде болюсной инъекции или вливания или непрерывного вливания. Фармацевтические носители, подходящие для облегчения такого способа введения, хорошо известны в данной области техники.

Фармацевтически приемлемые носители в целом включают любой и все подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие абсорбцию средства и им подобные, которые физиологически совместимы с антителом или родственной композицией или комбинацией, описанной в настоящем документе. Дополнительно примеры фармацевтически приемлемых носителей включают стерильную воду, физиологический раствор, буферный фосфатный физиологический раствор, декстрозу, глицерин, этанол и им подобные, а также любых их комбинации.

В одном таком аспекте, антитело может быть скомбинировано с одним или несколькими носителями в соответствии с желаемым путем введения, антитела могут быть, смешаны, например, с любым из следующего: лактоза, сахароза, крахмал, сложные эфиры целлюлозы и алкановых кислот, стеариновая кислота, тальк, стеарат магния, оксид магния, натриевые и кальциевые соли фосфорной и серной кислот, аравийская камедь, желатин, альгинат натрия, поливинилпирролидин, поливиниловый спирт и, необязательно, в дальнейшем таблетированы или инкапсулировано для общепринятого введения. Альтернативно, антитело может быть растворено в солевом растворе, воде, полиэтиленгликоле, пропиленгликоле, коллоидных растворах карбоксиметилцеллюлозы, этаноле, кукурузном масле, арахисовом масле, хлопковом масле, кунжутном масле, трагакантовой камеди и/или различных буферах. Другие носители, вспомогательные вещества и способы введения хорошо известны в фармацевтической области техники. Носитель может включать материал с контролируемым выходом или материал с задержкой во времени, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат по отдельности или с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области техники.

Дополнительные фармацевтически приемлемые носители, известные в данной области техники и описаны, например, в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. Жидкие композиции могут представлять собой растворы, эмульсии или суспензии и могут включать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие средства, солюбилизаторы, поверхностно-активные вещества, консерванты и хелаторы.

Рассматриваются фармацевтические композиции, в которых составлены ингибитор или антитело, описанное в настоящем документе, и один или несколько терапевтически активных агентов. Стабильные композиции антитела, описанного в настоящем документе, получают для хранения, смешивая указанное антитело, имеющее желаемую степень чистоты с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами, в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Композиции, предназначенные для применения путем in vivo введения, стерильны. Этого легко достигают путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны или другими способами. Антитело и другие терапевтически активные агенты, раскрытые в настоящем документе, также могут быть составлены в виде иммунолипосом, и/или заключены в микрокапсулы.

Введение фармацевтической композиции, включающей ингибитор или антитело, описанные в настоящем документе, может быть выполнено разнообразными путями, включая перорально, подкожно, внутривенно, интраназально, внутрикостно, трансдермально, через слизистую оболочку, местно, например, в виде гелей, мазей, лосьонов, кремов и т.д., внутрибрюшинно, внутримышечно, внутрилегочно, например, с применением ингаляционной технологии или легочных систем доставки, вагинально, парентерально, ректально или внутриглазным путем.

Иллюстративные композиции при применении для парентерального введения включают композиции, подходящие для подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции, например, в виде стерильного раствора, эмульсии или суспензии.

В одном воплощении, антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой только терапевтически активные агент, введенный субъекту, например, в качестве монотерапии, модифицирующей или предупреждающей заболевания.

В другом воплощении, антитело, описанное в настоящем документе, комбинировали с дополнительными активными веществами, например, в смеси или составного набора, для лечения субъекта, нуждающегося в терапии или профилактике, такой как комбинационная терапия, модифицирующая или предупреждающая заболевания.

Комбинация с одним или несколькими другими терапевтическими средствами или профилактическими средствами может включать стандартное лечение, например, антибиотики, стероидные и нестероидные ингибиторы воспаления, например, метотрексат и/или парацетамол и/или другую основанную на антителах терапию. Комбинация может конкретно включать средства, которые применяют для лечения первичного заболевания, в котором воспалительные процессы будут приводить к вторичным воспалительным состояниям заболевания. Первичное заболевание представляет собой, например, рак, и комбинация, например, будет включать антипролиферативные хемотерапевтические средства и/или цитостатические средства.

В комбинационной терапии, антитело может быть введено в виде смеси, или одновременно с одним или несколькими другими терапевтическими курсами лечения, например, до, одновременно или после сопутствующей терапии.

Биологические свойства антитела или соответствующего фармацевтического препарата, описанного в настоящем документе, могут быть охарактеризованы ex vivo в экспериментах в клетке, ткани и на целом организме. Как известно в данной области техники, лекарственные препараты часто тестируют in vivo на животных, включая без ограничений мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, свиней и обезьян, с целью измерения эффективности лекарственного препарата для лечения заболеваний или модели заболеваний, или измерения фармакокинетики, фармакодинамики, токсичности и других свойств лекарственного препарата. Животные могут быть отнесены к моделям заболеваний. Терапевтические средства часто тестируют на мышах, включая без ограничений, бестимусных мышей, мышей SCID, мышей с ксенотрансплантатами и трансгенных мышей (включая, мышей нокин и нокаут). Такие эксперименты могут предоставить значимые данные для определения потенциала антитела, которое предполагается применять в качестве терапевтического или в качестве профилактического средства с соответствующим временем полужизни, эффекторной функцией, ингибиторной активностью и/или иммунным ответом на пассивную иммунотерапию. Любой организм, предпочтительно, млекопитающие, может быть применен для тестирования. Например, благодаря своему генетическому сходству с людьми, приматы, обезьяны могут быть подходящими моделями для исследования терапевтического средства и, таким образом, могут быть применены для тестирования эффективности, токсичности, фармакокинетики, фармакодинамики, времени полужизни или другого свойства агента или композиции изобретения. В конечном итоге, для официального одобрения в качестве лекарственных препаратов требуются тесты на людях и, таким образом, конечно же данные исследования предусматриваются. Таким образом, антитело и соответствующая фармацевтическая композиция, описанные в настоящем документе, могут быть исследованы на людях для определения их терапевтической или профилактической эффективности, токсичности, иммуногенности, фармакокинетики и/или других клинических свойств.

В соответствии с изобретением получали конструкцию антитела, нацеленную на человеческий TNFR1 без агонистической перекрестной реактивности. Селективное ингибирование TNFR1 обеспечивало возможность нейтрализовать провоспалительную активность или воспалительные ответы TNF. Конкретно, обеспечивают моновалентного участника реакции связывания с высокой аффинностью, который, удивительным образом, не только позволяет избегать нежелаемых побочных эффектов соответствующего двухвалентного антитела, но, что более удивительно, не преобразуется в агониста при перекрестной сшивке антителами против человеческого Ig (ADA), потенциально вырабатываемыми в ходе повторного дозирования, типичного для схем лечения хронических заболеваний.

Анти-TNFR1 антитело, называемое ATROSAB, полученное в соответствии с WO2012035141A1, представляет собой гуманизированное антитело, производимое в клетках млекопитающих и демонстрирующее сходное связывание и нейтрализующее поведение как родительский мышиный IgG H398. Оно не показывало агонистической активности, которая ожидалась бы с таким полноразмерным антителом.

Тем не менее, оказалось, что антитело ATROSAB удивительным образом имеет агонистическую активность, если вариант получали с увеличенным сродством. Таким образом, созревания аффинности в принципе избегали для уменьшения не желаемых побочных эффектов. Настоящее изобретение теперь основано на неожиданном открытии того, что конструкция антитела, которое моновалентно связывается с рецептором huTNFR1, не будет демонстрировать такую агонистическую активность, даже если аффинность была увеличена до k_D менее чем 10^{-8}M и конкретно, даже если k_{off} была в значительной степени снижена.

Ингибитор, описанный в настоящем документе, представляет собой мощный TNFR1-селективный антагонист и дает новые терапевтическое возможности для лечения заболевания, в котором показаны анти-TNF терапевтические средства или в котором анти-TNF терапевтические средства не давали результаты или даже усугубляли прогрессирование заболевания, включая рассеянный склероз, застойную сердечную недостаточность, заболевания обмена веществ (диабет II-го типа), синдром выброса цитокинов, септический шок, острый (инсульт) и хронические нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера и Паркинсона). Ингибитор может представлять собой особенно полезную терапевтическую альтернативу при заболеваниях, о которых уже известно, что они клинически отвечают на анти-TNF лечение и, в особенности, при тех заболеваниях, где специфическая блокада TNFR1 и поддержание функции TNFR2 представляются перспективным терапевтическим подходом.

Предмет изобретения по следующим определениям рассматривается как воплощения настоящего изобретения.

1. Ингибитор рецептора huTNFR1, который представляет собой конструкцию человеческого или гуманизированного антитела, которое моновалентно узнает huTNFR1 через антигенсвязывающий фрагмент с K_D менее чем 5×10^{-9} M и k_{off} менее чем 10^{-3} c^{-1}, как определено для Fab-формата с помощью пьезокварцевого микровзвешивания (QCM) при 37°C.

2. Ингибитор по определению 1, который непосредственно ингибирует взаимодействие TNF с рецептором huTNFR1 или взаимодействие рецептора huTNFR1 с лимфотоксином-альфа, как определено в анализе на основе клеток, предпочтительно, с помощью анализа ингибирования TNFR1-опосредованной гибели клеток в клетках Kym-1 с величиной IC_{50} менее чем $5{,}0\times10^{-9}$, или с помощью анализа ингибирования выхода IL-6 из клеток HeLa с величиной IC_{50} менее чем $4{,}0\times10^{-8}$, или с помощью анализа ингибирования выхода IL-8 из клеток HT1080 с величиной IC_{50} менее чем $2{,}0\times10^{-8}$.

3. Ингибитор по определениям 1 или 2, в котором антигенсвязывающий фрагмент включает домен VH и VL, в которых по меньшей мере один из доменов VH и VL представляет собой функциональный вариант родительского домена с созревшей аффинностью, включающий, по меньшей мере, одну точечную мутацию в любой из последовательностей определяющих комплементарность областей (CDR), в которой:

a) родительский домен VH характеризуется CDR-последовательностями: SEQ ID NO: 1 (CDRH1) SEQ ID NO: 2 (CDRH2) и SEQ ID NO: 3 (CDRH3); и

b) родительский домен VL характеризуется CDR-последовательностями: SEQ ID NO: 4 (CDRL1) SEQ ID NO: 5 (CDRL2) и SEQ ID NO: 6 (CDRL3);

данные CDR-последовательности находятся в соответствии с номенклатурой Кэбота.

4. Ингибитор по определению 3, в котором, по меньшей мере, одна точечная мутация расположена в любой из SEQ ID NO: 2 (CDRH2) и/или SEQ ID NO: 6 (CDRL3), предпочтительно, в которой последовательность CDRH2 представляет собой SEQ ID NO: 7 и последовательность CDRL3 представляет собой SEQ ID NO: 8.

5. Ингибитор по определениям 4 или 5, в котором антигенсвязывающий фрагмент A выбирают из группы, состоящей из членов группы от i) до ii), в которой

i) представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который включает:

a) CDRH1 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 1;

b) CDRH2 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 10;

c) CDRH3 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 3;

d) CDRL1 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 4;

e) CDRL2 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 5; и

f) CDRL3 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 11; и

ii) представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который включает:

a) CDRH1 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 1;

b) CDRH2 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 10;

c) CDRH3 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 3;

d) CDRL1 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 4;

e) CDRL2 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 5; и

f) CDRL3 последовательность, определяемую SEQ ID NO: 6; или

B - антигенсвязывающий фрагмент, который представляет собой функционально активный вариант родительского антигенсвязывающего фрагмента, который представляет собой любого из членов группы A.

6. Ингибитор по определению 5, в котором функционально активный вариант включает:

a) по меньшей мере, один функционально активный CDR-вариант любой из CDR-последовательностей родительского антитела; и/или

b) по меньшей мере, одну точечную мутацию в каркасной области любой из VH-или VL-последовательностей.

7. Ингибитор по любому из определений 1-6, в котором конструкцию антитела выбирают из груп-

пы, состоящей из молекул Fab, молекул scFv, дисульфид-стабилизированного Fv (dsFv) антитела с половиной IgG1 и Fv-доменов, или функционально активного производного любого из вышеприведенных, предпочтительно в котором конструкция антитела соединена с гидрофильным полимером, таким как PEG, и/или слита с полипептидом, таким как человеческий сывороточный альбумин, трансферрин, альбумин-связывающие домены или пептиды, Ig-связывающие домены, PEG-имитирующие полипептид удлинения, Fc-фрагмент антитела, Fc-фрагмент антитела, несущий мутации, обеспечивающие предпочтительную гетеродимеризацию, или функциональный вариант любого из вышеприведенных полипептидов.

8. Ингибитор по определению 7, в котором конструкция антитела представляет собой любой из Fab, scFv, dsFv или Fv-доменов, который слит с Fc-фрагментом антитела, в котором Fc состоит из гетеродимера доменов CH2 и CH3, в которых домены CH2 и/или CH3 несут одну или несколько точечных мутаций, которые обеспечивают предпочтительную гетеродимеризацию над гомодимеризацией.

9. Ингибитор по любому из определений 1-8, в котором конструкция антитела содержит PEG, HES или PSA.

10. Ингибитор по любому из определений 1-9, в котором конструкция антитела включает Fv-домены с увеличенной аффинностью для связывания huTNFR1 по сравнению с родительскими Fv-доменами, в котором родительские Fv-домены характеризуются родительским доменом VH, определенным как SEQ ID NO: 12, и родительским доменом VL, определенным как SEQ ID NO: 16.

11. Ингибитор по определению 10, в котором, по меньшей мере, один из доменов VH и VL представляет собой функциональный вариант родительского домена с созревшей аффинностью, включающий, по меньшей мере, одну точечную мутацию в любой из CDR или каркасной (FR) последовательностей.

12. Ингибитор по определению 11, в котором:

a) домен VH включает или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-15;

b) домен VL включает или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-19; или

c) по меньшей мере, один из Fv-доменов включает функционально активный вариант любого из a) или b), в котором функционально активный вариант включает, по меньшей мере, одну точечную мутацию в любой из CDR или FR последовательностей.

13. Ингибитор по любому из определений 10-12,

в котором Fv-домены представляют собой комбинацию доменов VH и VL, которые

A:

выбирают из группы, состоящей из членов группы от i) до ix), в которой

i) VH включает или содержит SEQ ID NO: 13, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 17;

ii) VH включает или содержит SEQ ID NO: 14, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 18;

iii) VH включает или содержит SEQ ID NO: 15, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 19;

iv) VH включает или содержит SEQ ID NO: 14, и VL включает или содержит SEQ ID NO: 19;

v) VH включает или содержит SEQ ID NO: 15, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 18;

vi) VH включает или содержит SEQ ID NO: 13, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 18;

vii) VH включает или содержит SEQ ID NO: 14, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 17;

viii) VH включает или содержит SEQ ID NO: 13, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 19; и

ix) VH включает или содержит SEQ ID NO: 15, и
VL включает или содержит SEQ ID NO: 17; или

B:

Fv-домены представляют собой комбинацию доменов VH и VL, в которой любой из доменов VH и VL представляет собой функционально активный вариант родительского домена любого из членов группы A.

14. Ингибитор по любому из определений 10-13, в котором конструкция антитела имеет увеличенную термостабильность, равную, по меньшей мере, 60°C, или по меньшей мере 61°C, или по меньшей мере 62°C, или по меньшей мере 63°C, или по меньшей мере 64°C, или по меньшей мере 65°C, как определено с помощью динамического рассеяния света, в котором конструкция антитела включает Fv-домены, которые представляют собой функциональные варианты родительских Fv-доменов, по меньшей мере, с одной точечной мутацией в каркасной области любой из VH- или VL-последовательностей.

15. Фармацевтический препарат, включающий ингибитор, по любому из определений 1-14, и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Лекарственный препарат по определению 15, который составляют для парентерального применения, предпочтительно, путем внутривенного или подкожного введения.

17. Способ получения ингибитора по любому из определений 1-14 с применением рекомбинантной система экспрессии млекопитающих для экспрессии конструкции антитела.

18. Способ по определению 17, в котором применяют линию клеток-продуцентов CHO.

19. Ингибитор по любому из определений 1-14, для применения в лечении субъекта, представляющего собой человека, нуждающегося в анти-TNF терапии.

20. Ингибитор для применения по определению 19, в котором ингибитор повторно вводят субъекту.

21. Ингибитор для применения по определению 19 или 20, в котором субъект вырабатывает анти-DMARD или анти-лекарственные антитела.

22. Ингибитор для применения по любому из определений 19-21, в качестве терапии первой линии, в которой показаны анти-TNF терапии или небиологические DMARD терапевтические средства, или в качестве терапии второй линии, в которой анти-TNF или небиологические DMARD терапевтические средства не давали результата.

23. Ингибитор для применения по любому из определений 20-22, в котором субъект страдает от:

a) острого или хронического воспаления суставов, кожи и кишечника; и/или

b) аутоиммунных заболевания, ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита, ювенильного артрита, анкилозирующего спондилита, болезни Крона, рассеянного склероза, застойной сердечной недостаточности, метаболических заболеваний, синдрома выброса цитокинов, септический шок, острого и хронического нейродегенеративного заболевания, инсульта, болезни Альцгеймера и Паркинсона, язвенного колита, панкреатита, COPD, острых молниеносных вирусных или бактериальных инфекций, заболеваний обмена веществ, хронических нейродегенеративных заболеваний, генетически унаследованных заболеваний с TNF/TNFR1 в качестве причинного патологического медиатора, синдрома периодической лихорадки, херувизма и рака.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, но не ограничено ими.

Примеры

Пример 1. Связывание и биоактивность ATROSAB и H398.

ATROSAB (полноразмерное антитело, полученное в соответствии с WO2012035141) и его родительское мышиное антитело H398 (как описано в WO2008113515A2) демонстрировали сходную активность связывания с человеческим TNFR1 с величинами EC_{50}, равными 0,25 нМ и 0,15 нМ в стандартных анализах ELISA, соответственно (фиг. 1a). Кроме того, сходные аффинности (величины K_D) 0,35 нМ для ATROSAB и 0,23 нМ в случае H398 определяли с помощью технологии QCM в условиях высокой плотности рецепторов (фиг. 1b и c).

Несмотря на сходное связывание в ELISA и QCM, H398 продемонстрировал от 10 до 12 раз более сильное ингибирование TNF- или LT-индуцированного выхода IL-8 из клеток HT1080 по сравнению с ATROSAB (фиг. 2). Принимая во внимание тот факт, что рецепторы в обоих измерениях, ELISA и QCM (выполняли на чипе с высокой плотностью) были представлены в избытке по сравнению с ситуацией in vitro на клетках HT1080, в анализе выхода IL-8, было решено повторить измерения QCM с помощью чипа с низкой плотностью рецепторов. Как показано на фиг. 3, величина K_D, равная 4,5 нМ, была получена для ATROSAB, а для H398 была получена величина K_D, равная 1,6 нМ (смотри, также таблица 1). Интересно, что в то время как величина K_D для ATROSAB и H398 отличались на фактор, равный 2,8, скорость ассоциации (k_{on}) ATROSAB была в 2,6 раз выше, чем k_{on} из H398, и скорость диссоциации (k_{off}) H398 была примерно в 7,6 раз медленнее, чем диссоциация ATROSAB (фиг. 3, табл. 1). Таким образом, конкурируя с TNF или LT за связывание с рецептором, ATROSAB (более высокая скорость ассоциации) занимает свободные рецепторы быстрее и H398 (сниженная скорость диссоциации) блокирует занятые рецепторы дольше.

Принимая во внимание, что в условиях стандартного анализа выхода IL-8 (смотри, ниже), рецепторы претерпевают непрерывную интернализацию, и интернализированные рецепторы все еще опосредуют сигналинг, антитело, который остается дольше связано с рецептором (сниженная скорость диссоциации) может быть более сильным ингибитором. pH-зависимый эффект из-за кислых условий в эндосомальном отделении может быть исключен, поскольку связывание ATROSAB и H398 с человеческим TNFR1-Fc в ELISA не значительно не отличалось между собой в экспериментах, выполненных при pH 5,4, pH 6,4, pH 7,4 и pH 8,4 (данные не приведены). Таким образом, было решено приложить усилия для разработки вариантов ATROSAB с "созревшей скоростью диссоциации".

Таблица 1

Связывание и биоактивность ATROSAB и H398

	ATROSAB	H398	Фактор
EC_{50}, ELISA [нМ]	0,25	0,15	1,7
K_D, чип высокой плотности [нМ]	0,35	0,23	1,5
IC_{50}, TNF [нМ]	42	4,1	10
IC_{50}, LT [нМ]	7,6	0,65	12
K_D, чип низкой плотности [нМ]	4,5	1,6	2,8
k_{off}, чип низкой плотности [сек$^{-1}$]	$4,7 \times 10^{-3}$	$6,2 \times 10^{-4}$	7,6

Пример 2. Фаговый дисплеи, часть 1 - сайт-направленный мутагенез и равновесный отбор.

В предыдущей работе (кандидатская диссертация Кирстина Зеттлица, 2010) ATROSAB подвергали созреванию аффинности с помощью фагового дисплея библиотеки индивидуально рандомизированных CDRH1, CDRH2, CDRL1 и CDRL2. В рамках данных CDR, положения, идентифицированные в модельной структуре IZI06.1 как экспонированные в антигенсвязывающем сайте, были рандомизированы. Отборы выполняли в равновесных условиях с помощью растворимого биотинилированного huTNFR1-Fc в комбинации с покрытыми стрептавидином магнитными Dynabeads. Условия отбора представлены в табл. 2. Хотя предпочтительные остатки были идентифицированы для всех четырех CDR, мутации были обнаружены только в CDRH2 (Табл. 3), что показывает некоторые улучшения в связывание TNFR1. ScFvIG11 изолировали из раунда отбора 6 и выявляли связывание с TNFR1-Fc с K_D в 2 раза более высокой по сравнению cscFvIZI06.1 (ATROSAB), как определено с помощью QCM. ScFvIG11 отбирали для дополнительных экспериментов из-за его почти трехкратно сниженной константы скорости диссоциации k_{off} of $2,6\times10^{-4}$ c^{-1} по сравнению cscFvIZI06.1 ($7,6\times10^{-4}$ c^{-1}), что указывает на сниженную диссоциацию антитела из комплекса антитело-рецептор. Выравнивание последовательности scFvIZI06.1 и scFvIG11 показано на фиг. 4.

Таблица 2

Условия равновесного отбора с применением биотинилированного антигена

Раунды отбора	Антиген (нМ)	Инкубация	Фаг	Гранулы	Промывка, MPBST (PBS)
0	moR1, 20 нМ	1 час, RT	10 мкл = $2x10^{11}$	500 мкг	=> применение супернатанта для отбора
1ый	10 нМ	4 часа, RT	10 мкл = $2x10^{11}$	500 мкг	3 (1) x
2ой	10 нМ	o/n, 4°C; 1 час, RT	10 мкл = $4x10^{10}$	500 мкг	15 (5) x
3ий	1 нМ	o/n, 4°C; 1 час, RT	1 мкл = $4x10^{9}$	100 мкг	20 (10) x
4ый	1 нМ	3 часа, RT	1 мкл = $4x10^{9}$	100 мкг	10, 1 час, RT (10) x
5ый	0,1 нМ	o/n, 4°C; 1 час, RT	1 мкл = $4x10^{9}$	100 мкг	10, 2 часа, RT (10) x
6ой	0,1 нМ	3 дня, 4°C; 1 час, RT	1 мкл = $4x10^{9}$	100 мкг	10, 2 часа, RT (10) x

Таблица 3

Положения для сайт-направленного мутагенеза, библиотека L2a

CDRH2 (Кэбат)	502a3456789602345
scFvIZI06.1	EIYPYSGHAYYNEKFKA
Рандомизированные остатки	X.X.XX.X.X.X..
Расчетное разнообразие	$2,68 \times 10^{8}$
Размер библиотеки	$2,57 \times 10^{8}$
Функциональность	73%

Пример 3. Фаговый дисплей часть 2 - случайный мутагенез и конкурентный отбор.

Библиотеку, примененную для следующих экспериментов по отбору, создавали с помощью ПЦР с внесением ошибок целой последовательности, включавшей VH и VL из scFvIG11 ($6,2\times10^{5}$ колониеобразующих единиц). Десять проанализированных одиночных клонов выявили общую скорость мутагенеза, равную 7,5 мутации на тысячу пар оснований (7,5/т.п.н.). В CDR, покрывающей 25% всей последовательности scFv (180 из 729 п.н.), наблюдали 15 из 55 мутации (27%), что указывает на довольно равномерное распределение мутаций.

Отбор клона scFvT12B с созревшей аффинностью.

Этап отрицательного отбора с помощью человеческого TNFR2 выполняли до пэннинга против человеческого TNFR1, для сохранения селективности рецептора в ходе отбора. Отображаемые фрагменты scFv с улучшенным поведением связывания отбирали с применением человеческого TNFR1-Fc, иммобилизованного на иммунопробирках. Общее изменение связывания пула отбора регистрировали с помощью поликлонального фагового ELISA после каждого раунда отбора, демонстрируя примерно двукратное улучшение после трех этапов отбора (фиг. 5a, условия отбора приведены в табл. 4).

Таблица 4

Условия отбора

Этап отбора	Антиген	Фаги	Конкуренция
1	1 мкг/мл	10 мкл	-
2	0,1 мкг/мл	1 мкл	-
3	0,01 мкг/мл	1 мкл	10 нМ*

* Немеченый человеческий TNFR1 в растворе применяли для конкуренции для обоих, отбор на Dyna-Beads и в иммунопробирках.

Фаги-кандидаты, показавшие самое сильное связывание с человеческим TNFR1 в ELISA (табл. 5), экспрессировали как растворимые фрагменты scFv и подвергали кинетическому анализу с помощью QCM, применяя сенсорный чип с умеренной плотностью рецепторов. Клон scFvT12B показал самый медленный выхода из рецептора, указывая на самую низкую величину k_{off} (фиг. 5b, табл. 5).

Таблица 5

Относительные величины EC_{50} и k_{off} кандидатов библиотеки фагового дисплея EP03 по сравнению с scFvIZI06.1

Клон	EC_{50}	k_{off}
IZI06.1	1	1
IG11	n.d.	0,31
T12B	0,017	0,25
B12B	0,021	0,77
T2A	0,023	0,47
T1C	0,009	0,76
B8E	0,046	0,41
T12E	0,047	0,50
T7B	0,062	0,47
T9H	0,041	0,38
B6F	0,251	0,66
T10D	0,006	0,72

Вместе взятые, scFvT12B показал лучший характеристики связывания в определении скорости диссоциации скрининг по QCM, что позволяет рассматривать его в качестве ключевого атрибута для улучшение блокады рецептора. Последовательность ДНК из scFvT12B изменяли в трех положениях по сравнению с scFvIG11. Q1H и T53S в CDRH2 тяжелой цепи вариабельного домена (VH), а также S91G в CDRL3 легкой цепи вариабельного домена (VL, фиг. 4).

Характеристика scFvT12B.

Растворимые фрагменты антител scFvT12B, scFvIZI06.1 и scFvIG11 получали в периплазме E.coli TG1 и надлежащую экспрессию подтверждали с помощью SDS-PAGE, где можно было наблюдать незначительные примеси в очищенных образцах (фиг. 6a). Зависимое от концентрации связывание с человеческим TNFR1 продемонстрировали в ELISA, выявив величины EC_{50}, равные 3,8 нМ, 2,6 нМ и 2,0 нМ для scFvIZI06.1, scFvIG11 и scFvT12B, соответственно (фиг. 6b, табл. 6). Таким образом, scFvT12B показал улучшенное связывание в примененных условиях, 1,3-кратное по сравнению с scFvIG11. Величины K_D, как было определено с помощью QCM, были равны 28,9 нМ для scFvIZI06.1, 24,9 для scFvIG11 и 6,0 для scFvT12B, демонстрируя 4,1-кратное улучшение связывания scFvT12B по сравнению с scFvIG11 (фиг. 6c, табл. 6). Изменение в аффинности происходит в результате улучшения константы скорости ассоциации (2,1-кратное увеличение k_{on}) и константа скорости диссоциация (2,0-кратное снижение k_{off}, табл. 6). Наконец, scFvT12B blocked TNF индуцирует выход интерлейкин-8 in vitro с улучшенной антагонистической активностью по сравнению с scFvIZI06.1 и scFvIG11 (фиг. 6d). Полученные данные не могут быть сведены к стандартной кривой ингибирования из-за возрастающего сигнала при высоких концентрациях примененного scFv. Однако аппроксимированные концентрации полумаксимального ингибирования отражают примерно в семь раз более сильную блокаду человеческого TNFR1 под действием scFvT12B по сравнению с scFvIG11 (табл. 6).

Таблица 6

Характеристика scFvT12B по сравнению с scFvIZI06.1 и scFvIG11. Улучшение указано как фактор по отношению к величинам scFvIG11

	scFvIZI06.1	scFvIG11	scFvT12B	Улучшение
EC_{50} (нМ)	3,8	2,6	2,0	1,3
k_{on} (M^{-1}сек$^{-1}$)	$5,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	2,1
k_{off} (сек$^{-1}$)	$1,4 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-2}$	2,0
K_D (нМ)	28,9	24,9	6,0	4,1
IC_{50} (нМ)*	~200	~300	~45	~6,7

* Аппроксимированные IC_{50} величины, рассчитанные из оценки полученных данных по 11-8 после исключения последних 1-2 точек.

Пример 3. Повторная гуманизация H398.

Как было упомянуто выше, H398 оказалось более эффективным в блокировании TNF-опосредованных клеточных ответов по сравнению с ATROSAB (Zettlitz et al. 2010), таким образом, способ гуманизации, который в результате привел к scFvIZI06.1 (ATROSAB) был повторен. Для идентификации альтернативных человеческих зародышевых генов, приоритетной была гуманизированность над идентичностью последовательности, и клоны с довольно низкой гомологией с scFvH398 применяли для повторной гуманизации VH и VL. Гены, названные 3-11*01 и 1-39*02, отбирали, благодаря их выраженной гуманизированности (Abhinandan и Martin 2007), на которую указывали положительные z-показатели более высокой величины (Табл. 7). CDR-последовательности мышиного антитела H398 переносили на каркас выбранной зародышевой последовательности, получая в результате фрагмент антитела scFvFRK13. Анализ канонической структуры вновь созданного scFv с помощью самогенерируемых шаблонов SDR (Copyright© 1995, Andrew C.R. Martin, UCL) показал наличие атипичных аминокислот в положении H71 и L2. Таким образом, данные остатки были заменены аминокислотами, примененными для генерации ATROSAB (VH: R71A, VL: 12V). Изменения в аминокислотной последовательности тяжелой и легкой цепи гуманизированного scFv перед (scFvFRK13.1) и после замены аминокислот (scFvFRK13.2) по сравнению с scFvIZI06.1, приведены в выравнивании на фиг. 7.

Таблица 7

Гуманизация H398

Локус	Клон	Идентичность	BLAST-показатель	z-показатель
H398-VH	-	-	-	-2,023
1-69*08	DP88	60,2%	127	0,317*
3-11*01	DP35	45,9%	109	1,987
Локус	Клон	Идентичность	BLAST-показатель	Z-показатель
H398-VL	-	-	-	-1,829
2D-28*01	DPK15	79,0%	161	-1,401*
1-39*02	DPK9	54,0%	109	1,204

* Зародышевый ген, примененный для гуманизированного IZI06.1 (ATROSAB scFv).

Экспрессия и характеристика scFvFRK13.

Помимо scFvFRK13.1 и scFvFRK13.2, были клонированы и получены комбинации их тяжелой и легкой цепи вариабельных доменов и комбинации с тяжелой или легкой цепью scFvT12B (фиг. 8). ScFv фрагменты анализировали в SDS-PAGE в восстанавливающих условиях, демонстрируя целую экспрессию и полную очистку только для scFvFRK13.5 и scFvFRK13.7 (фиг. 8b). Полосы с более высокой и более низкой молекулярной массой наблюдали для всех других конструкций, что указывает на примеси образцов белка или продуктов деградации. Кроме того, только scFvFRK13.5 и scFvFRK13.7 показали чистые пики в гель-фильтрационной хроматографии, соответствующие расчетной молекулярной массе (фиг. 8c). Пониженные сигналы более короткого времени удерживания были обнаружены для обоих белков, возможно демонстрируя существование димерных scFv или агрегатов более высокого порядка. Эти данные показывают, что вновь полученные гуманизированные домены VH приводят к нестабильным молекулам scFv.

Рецептор связывание scFvFRK13.1-13.8 далее проанализировали в ELISA (фиг. 9a) с помощью scFv антитела T12B и IZI06.1 в качестве контрольных белков. В то время как scFvFRK13.5, scFvFRK13.7 и scFvT12B связываются с человеческим TNFR1 с сопоставимыми величинами EC_{50}, равными около 1 нМ (Табл. 8), оставшийся набор scFv показал слабое связывание только при концентрации выше 100 нМ. Сходно, scFvFRK13.5, scFvFRK13.7 и scFvT12B ингибируют TNF-индуцируемый выход IL-8 из клеток HT1080 с величинами IC_{50}, равными около 300 нМ. Контрольный белок scFvIZI06.1 показал блокаду TNFR1 с величиной IC_{50}, равной 932 нМ (фиг. 9b, табл. 8). Кроме того, с помощью динамического рассеяния света исследовали термостабильность. ScFvFRK13.5 и scFvFRK13.7 показали температуры плавления, равные 63°C и 65°C, по сравнению с 59°C и 55°C для scFvIZI06.1 и scFvT12B, соответственно (фиг. 10). Следует отметить, что scFvIZI06.1 показал уже увеличение в средних показателях счета при низкой температуре, что указывает на частичную дестабилизацию структуры белка. Напротив, сигналы из scFvT12B, scFvFKR13.5 и scFvFRK13.7 были почти постоянно ниже точки плавления, что выявило улучшенную стабильность также в более низком температурном диапазоне.

Таблица 8

Характеристика гуманизированных фрагментов антител scFvH398

	H398	IZI	T12B	FRK13.5	FRK13.7
Z-показатель VH	-2,023	-0,419	-0,500	0,760	0,698
Z-показатель VL	-1,829	-1,172	-1,225	0,188	0,051
EC_{50} (нМ)	n.d.	3,07	1,14	1,06	1,09
IC_{50} (нМ)	n.d.	932	309	367	284
T_m (°C)	n.d.	59	55	63	65

В заключении, scFv антител, содержавших вновь полученный гуманизированный домен VH, не мо-

гут быть экспрессированы надлежащим образом и, вероятно, разрушают связывание с человеческим TNFR1. ScFvFRK13.7, содержавший повторно гуманизированный домен VL и домен VH из scFvT12B, экспрессировали до достаточной чистоты и он связывался с huTNFR1-Fc одинаково сильно по сравнению с антителом scFvT12B с одноцепочечным Fv с "созревшей скоростью диссоциации". Кроме того, scFvFRK13.7 показал улучшенную термостабильность.

Пример 4. Превращение scFvFRK13.7 в IgG и Fab-фрагмент.

Тяжелую и легкую цепь вариабельных доменов из scFvFRK13.7 вводили в основание ATROSAB IgG и ATROSAB Fab путем стандартного клонирования и ПЦР-технологий. IgG-FRK13.7 и Fab-FRK13.7 в дальнейшем называли IgG13.7 и Fab13.7, соответственно. Белки получали временно в клетках HEK293T и очищали с помощью аффиной хроматографией на A-белке (IgG13.7) или антителе (Fab13.7). IgG13.7 подвергали дополнительной препаративной SEC (FPLC) из-за минорных пиков при более высокой молекулярной массе. Экспрессию и целостность белка контролировали с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих (фиг. 11a) и невосстанавливающих условиях (фиг. 11c), а также с помощью гель-фильтрационной хроматографии (SEC, фиг. 11c). ATROSAB и FabATROSAB (FabATR) применяли в качестве контролей во всех экспериментах. Все четыре белка показали в ходе электрофореза полосы, коррелирующие с рассчитанной молекулярной массой. Сходным образом, наблюдаемые пики поглощения в гель-фильтрации подтвердили гомогенность белковых препаратов, все кажущиеся молекулярные массы были в соответствии с ожидаемыми размерами. Fab13.7 и IgG13.7 сохранили свою специфичность для человеческого TNFR1 в ELISA в сравнении с человеческим TNFR2 и обоими мышиными рецепторами TNF (фиг. 12).

Связывание антител FRK13.7 с человеческим TNFR1.

IgG13.7 и Fab13.7 связывается с человеческим TNFR1-Fc в ELISA с величинами EC_{50}, равными 1,4 нМ для Fab13.7, а также 0,76 нМ в случае IgG13.7. Контрольные белки ATROSAB и FabATR связывали в 1,4 и в 8,7 раз слабее по сравнению с IgG13.7 и Fab13.7, соответственно, на что указывают более высокие величины EC_{50} (фиг. 13).

Кроме того, оценку динамики связывания выполняли с помощью пьезокварцевого микровзвешивание, применяя сенсорные чипы с умеренной (86 Гц) или высокой (184 Гц) плотностью рецепторов. Контрольное антитело ATROSAB продемонстрировало четкое двухфазное взаимодействие с человеческим TNFR1-Fc при умеренной плотности рецепторов, состоящих из пропорции или с высоким, или с низким сродством, как представлено величинами K_D, равными 0,38 нМ и 78 нМ, соответственно (фиг. 14a, табл. 9). Напротив, IgG13.7 показал в анализе связывания один с двумя (OneToTwo) величины k_{off} в диапазоне от $1{,}77\times10^{-4}$ до $9{,}30\times10^{-4}$ (данные не приведены), приводящие в результате к очень низким количествам диссоциирующего белка и, таким образом, трудно к детектируемым различиям между моно- и двухвалентным связывающимися и диссоциирующими субпопуляциями. Следовательно, IgG13.7 тестировали на чипе с высокой плотностью, где двухвалентное взаимодействие явно доминирует и вкладом моновалентного взаимодействия в сигнал связывания можно в значительной степени пренебречь, что позволяет проводить оценки в анализе один с одним (OneToOne). Определенная величина K_D, равная 0,11 нМ, отражает 3,5-кратное улучшение по сравнению с ATROSAB, принимая во внимание ситуацию двухвалентного связывания (фиг. 14c). Моновалентный контрольный белок FabATR диссоциирует почти полностью с чипа рецепторов умеренной плотности в течение периода обнаружения (5 мин), выявляя константу скорости диссоциации (k_{off}) $1{,}5\times10^{-2}$ c^{-1} и величина K_D, равную 30 нМ (фиг. 14b). Напротив, диссоциация Fab13.7 из комплекса антитело-рецептор была значительно снижена, на что указывают величина k_{off}, равная $7{,}3\times10^{-4}$ c^{-1}, в то время как константа скорости ассоциации (k_{on}) была почти идентична по сравнению с FabATR. Это приводит к 19-кратному усилению аффинности Fab13.7 к человеческому TNFR1 с величиной K_D, равной 1,6 нМ (фиг. 14d, табл. 9).

Таблица 9

Определение аффинности IgG13.7 и Fab13.7

	ATROSAB	IgG13.7	FabATR	Fab13.7
Bmax1 (Hz)	16,8		6,36	8,93
Bmax2 (Hz)	10,73	55,93		
$k_{on}1$ ($M^{-1}сек^{-1}$)	$2{,}82 \times 10^{5}$		$5{,}01 \times 10^{5}$	$4{,}70 \times 10^{5}$
$k_{off}1$ ($сек^{-1}$)	$2{,}19 \times 10^{-2}$		$1{,}50 \times 10^{-2}$	$7{,}32 \times 10^{-4}$
K_D1 (нМ)	78		30	1,6
$k_{on}2$ ($M^{-1}сек^{-1}$)	$1{,}06 \times 10^{6}$	$5{,}35 \times 10^{5}$		
$k_{off}2$ ($сек^{-1}$)	$4{,}07 \times 10^{-4}$	$5{,}92 \times 10^{-5}$		
K_D2 (нМ)	0,38	0,11		

Таким образом, моновалентная конструкция антитела ATROSAB (FabATR) оказалась намного хуже участника реакции связывания с huTNFR1 по сравнению с Fab13.7. Аффиность scFv IZI-06.1 при связывании с huTNFR1 сходна с FabATR, если аффинность scFv измеряли в формате Fab. Хотя измерения scFv IZI-06.1 способами предшествующего уровня техники может показать лучшие результаты (из-за эффектов авидности димеризованных молекул scFv) сродство по связыванию (в формате Fab) было намного

ниже и равно FabATR.

In vitro биоактивность и фармакокинетика производных белков scFvFRK13.7.

Для исследования влияния созревания аффинности и повторной гуманизации на per se антагонического антитела ATROSAB, протестировали потенциал scFvFRK13.7-произведенный IgG и Fab для индукции выхода интерлейкина-8 и -6 из клеток HT1080 и HeLa, соответственно. ATROSAB, который включали в качестве контроля, показал описанную несущественную активацию рецептора только в случае IL-8 (Richter et al. 2013), при выполнении экспериментов по выходу IL-6 не наблюдали стимуляции выше клеточного фона (фиг. 15b и c). Моновалентный контрольный белок FabATR не стимулировал ни IL-8, ни выход IL-6 из соответствующего типа клеток. Закономерно, не наблюдали увеличения индуцированного Fab13.7 выхода интерлейкина по сравнению с необработанными клетками. Однако IgG13.7 явно стимулировал выход IL-8 и IL-6, приводящий в результате к уровням интерлейкина, равным от 20% до 87% по сравнению с эффектом 33 нМ TNF, который был примерно равен максимальному ответу, стимулированному TNF в предыдущих экспериментах.

Интересно отметить, что выход IL-8 из клеток HT1080, вызываемый 0,1 нМ TNF, ингибируется ATROSAB и FabATR с сопоставимыми величинами IC_{50}, равными 118 нМ и 151 нМ, соответственно (фиг. 16a). Сходным образом, ATROSAB и FabATR показали одинаково сильное ингибирование выхода IL-6 из клеток HeLa, вызываемого 0,1 нМ TNF (фиг. 16b, табл. 10). Из-за его агонистической активности, концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}) IgG13.7 не определяли. Напротив, Fab13.7 ингибирует выход IL-8 и IL-6 в ответ на 0,1 нМ TNF дозозависимым образом с величинами IC_{50}, равными 18,7 нМ и 31,4 нМ, соответственно, выявляя от 5,8-кратное до 6,2-кратного улучшение нейтрализации TNF по сравнению с полноразмерным IgG ATROSAB.

Кроме того, исследовали потенциал полноразмерного IgG и Fab-фрагмента, происходящего из scFvFRK13.7, для стимуляции или ингибирования TNFR1-опосредованной гибели клеток в клетках Kym-1. В соответствии с контрольными белками ATROSAB и FabATR, стимуляция под действием Fab13.7 не приводила к какой-либо детектируемой цитотоксичности (фиг. 17a). С другой стороны, IgG13.7 уничтожал почти 100% клеток Kym-1 в широком диапазоне концентраций, эквивалентно положительному контролю TNF, который применяли при 33 нМ. Для исследования ингибирующей активности неагонистического Fab13.7, клетки Kym-1 инкубировали с 0,01 нМ TNF, убивавшем около 90% клеток при единственной обработке. Fab13.7 и контрольные белки ATROSAB и FabATR ингибировали TNF-опосредованную гибель клеток с величинами IC_{50}, равными 4,7 нМ, 24 нМ и 37 нМ, соответственно, подтверждая результаты анализов по выходу интерлейкина (фиг. 17b, табл. 10).

Таблица 10

Биоактивность антител ATROSAB и FRK13.7

	TNF (33 нМ)	ATROSAB	FabATR	IgG13.7	Fab13.7	Клетки
Стимуляция TNFR1						
Выход IL-8 (пг/мл)	20850	240	128	4231	138	137
Выход IL-6 (пг/мл)	1667	231	179	1454	101	191
Цитотоксичность (%)	92	-	-	до 100	-	-
Ингибирование клеточных ответов на 0,1 нМ (IL-6, IL-8) или 0,01 нМ TNF (цитотоксичность)						
$IC_{50,\ IL\text{-}8}$ (нМ)	-	118	151	-	19	-
$IC_{50,\ IL\text{-}6}$ (нМ)	-	179	145	-	31	-
$IC_{50,\ цитотокс}$ (нМ)	-	24	37	-	4,7	-

Для оценки риска потенциальной агонистической активности Fab13.7 в присутствии специфических к лекарственным средствам антител, протестировали биоактивность Fab13.7 на клетках HT1080 в комбинации с поликлональной сывороткой к человеческому Fab, изолированной из козла. В стандартных анализах по связыванию ELISA, может быть продемонстрировано связывание специфической к человеческому Fab козьей сыворотки с Fab13.7 (фиг. 18a), однако, не обнаружили увеличения стимулирующей активности выше клеточного фона для Fab13.7 вместе с 64 мкг/мл сыворотки в анализе выхода IL-8 (фиг. 18b). Тем не менее, ATROSAB явно показал увеличенную индукцию IL-8 в ответ на совместную обработку сывороткой против человеческого Fab (фиг. 18b). Сходные результаты получали в предыдущих экспериментах с применением ATROSAB вместе с антителом против человеческого Fc (не опубликовано, данные не приведены).

Фармакокинетические свойства FabATR и Fab13.7 анализировали с помощью трансгенных мышей C57BL/6J, у которых экстраклеточный домен TNFR1 был заменен человеческим аналогом (фиг. 19). Исходные времена полужизни, равные около 0,25 часа указывали на быстрое распределение в организме. Оба Fab-фрагмента быстро удалялись из крови, конечное время полужизни было равно 1,7 ч для FabATR и 1,56 ч в случае Fab13.7. Данные результаты выявили неизмененный фармакокинетический профиль антагонического Fab13.7 усовершенствованного TNFR1, по сравнению с Fab-фрагментом ATROSAB. Краткая информация о данных представлена в табл. 11.

Таблица 11

Фармакокинетический анализ FabATR и Fab13.7

Конструкция	Исходное время полужизни [часы]	Конечное время полужизни [часы]	Площадь под кривой [%*час]	
			% от 3 мин	% из ID
FabATR	0,24 ± 0,02	1,56 ± 0,07	45,24 ± 2,68	51,91 ± 6,04
Fab13.7	0,25 ± 0,06	1,7 ± 0,15	41,99 ± 5,53	36,04 ± 5,23

Пример 5. PEGилированное производное Fab13.7.

С целью преодоления проблемы довольно короткого времени нахождения Fab13.7 в кровотоке in vivo, исследовали несколько стратегий, предназначенных для увеличения гидродинамического радиуса, с одной стороны, и для включения FcRn-опосредованного рециклинга лекарственного препарата, с другой стороны.

В первую очередь, Fab13.7 (Fd: SEQ ID NO: 25, легкая цепь: SEQ ID NO: 26) модифицировали в тяжелой цепи константного домена 1 (CH1), как описано (Choy et al. 2002). Коротко говоря, части природной аминокислотной последовательности шарнирной области IgG1, включая первый остаток цистеина, с последующими двумя остатками аланина, добавляли с С-конца к домену CH1 (...DKTHTCAA (SEQ ID NO: 34), фиг. 20a, SEQ ID NO: 27, легкая цепь, смотри, Fab13.7, SEQ ID NO: 26), что приводило в результате к Fab13.7'. PEG_{40000} конъюгировали с Fab13.7' с помощью 0,625 мМ TCEP с целью уменьшения потенциального возможного формирования дисульфидных связей вновь введенного остатка цистеина (фиг. 20b). Полученный таким способом $Fab13.7_{PEG}$ связывался с иммобилизованным человеческим слитым белком TNFR1-Fc в ELISA с 2,6-кратным увеличением величины EC_{50} по сравнению с немодифицированным Fab13.7 (фиг. 20c, табл. 12). $Fab13.7_{PEG}$ не показал значительной активации TNFR1 in vitro, как было определено в анализе выхода IL-8 с помощью клеток HT1080 (фиг. 20d). В тех же условиях анализа, $Fab13.7_{PEG}$ ингибировал выход IL-8 из клеток HT1080, индуцированный 0,1 нМ растворимым TNF, с 4,9-кратным увеличением величины IC_{50}, при сравнении с Fab13.7. (фиг. 20e, табл. 12). Модификация Fab13.7 с PEG_{40000} привела к улучшенному in vivo фармакокинетическому профилю. По сравнению с Fab13.7, исходное и конечное время полужизни и площадь под кривой увеличились на факторы, равные 3,8, 18,0 и 22,2, соответственно (фиг. 20f, табл. 12).

Таблица 12

Биоактивность моновалентных вариантов Fab13.7

Молекула	Связывание по ELISA EC_{50} [нМ]	Ингибирование IL-8 IC_{50} [нМ]	Исходное время полужизни [часы]	Конечное время полужизни [часы]	Площадь под кривой [%*час]
$Fab13.7_{PEG}$	5,0	98,2	0,92 ± 0,04	28,04 ± 6,76	1008,0 ± 142,42
Fab13.7-MSA	0,7	65,5	1,85 ± 0,31	6,71 ± 0,85	966,20 ± 13,97
$IgG13.7_{half}$	0,8	63,3	0,89 ± 0,38	3,51 ± 0,32	205,03 ± 56,18
Fab13.7-Fc_{kih}0DS	0,5	61,2	1,67 ± 0,51	13,88 ± 0,69	967,64 ± 101,82
Fv13.7-Fc_{kih}0DS	0,3	30,7	0,97 ± 0,23	16,38 ± 0,49	701,30 ± 119,62

Варьирующие величины были обнаружены в различных отдельных экспериментах.

Пример 6. Слитый белок Fab13.7-MSA.

В другом подходе, Fab13.7 был генетически слит с мышиным сывороточным альбумином (MSA), присоединенным через 12-аминокислотный линкер (фиг. 21a, Fd-MSA: SEQ ID NO: 28, легкая цепь, см. Fab13.7, SEQ ID NO: 26). Полученный таким способом Fab13.7-MSA показал одну единственную полосу в SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях, соответствующую расчетной молекулярной массе 114 кДа (фиг. 21b). В восстанавливающих условиях наблюдали две полосы, учитывая диссоциированную легкую цепь и Fd фрагмент, слитый с MSA-фрагментом. Гель-фильтрационная хроматография подтвердила целостность структуры белка и отсутствие агрегированных или олигомеризованных фракций белка (фиг. 20c). Fab13.7-MSA связывался с иммобилизованным человеческим слитым белком TNFR1-Fc в ELISA с 1,7-кратным увеличением величины EC_{50} по сравнению с немодифицированным Fab13.7 (фиг. 21d, табл. 12) и не показал значительной активации TNFR1 in vitro, как было определено в анализе выхода IL-8 с помощью клеток HT1080 (фиг. 21e). В тех же условиях анализа, Fab13.7-MSA ингибировал выход IL-8 из клеток HT1080, индуцированный 0,1 нМ растворимым TNF, с 1,9-кратным увеличением величины IC_{50} при сравнении с Fab13.7. (фиг. 21f, табл. 12). Слияние Fab13.7 с MSA привело к улучшенному in vivo фармакокинетическому профилю. По сравнению с Fab13.7, исходное и конечное время полужизни, а также площадь под кривой увеличились на факторы, равные 7,8, 4,3 и 21,3, соответственно (фиг. 21g, табл. 12).

Пример 7. Полуантитело IgG-13.7.

Для создания молекулы моновалентного IgG, содержавшего интактную пропорцию Fab13.7 и, кро-

ме того, сайт связывания FcRn, который находился на переходе CH2-CH3, аминокислотную композицию шарнирной области IgG1 и Fc-часть изменяли для того, чтобы избежать димеризации тяжелой цепи (фиг. 22a, тяжелая цепь $IgG13.7_{half}$: SEQ ID NO: 29, легкая цепь смотри Fab13.7, SEQ ID NO: 26). Кратко, два цистеина шарнирной области заменяли серинами (C224S, C227S), чтобы препятствовать образованию межцепочечных дисульфидных связей. Четыре дополнительные мутации вводили в домен CH3 (P393A, F403R, Y405R, K407D), для того, чтобы препятствовать гомомерным взаимодействиям CH3-CH3 (смотри, также Gu et al. 2015, SEQ ID NO: 29, легкая цепь смотри Fab13.7, SEQ ID NO: 26). Полученный таким способом $IgG13.7_{half}$ показал одну единственную полосу в SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях, соответствующую расчетной молекулярной массе 73 кДа (фиг. 22b). В восстанавливающих условиях наблюдали две полосы, составляющие тяжелую и легкую цепь. Гель-фильтрационная хроматография подтвердила целостность структуры белка и отсутствие агрегированных или олигомеризованных фракций белка (фиг. 21c). $IgG13.7_{half}$ связывался с иммобилизованным человеческим слитым белком TNFR1-Fc в ELISA с 1,9-кратным увеличением величины EC_{50} по сравнению с немодифицированным Fab13.7 (фиг. 22d, табл. 12) и не показывал значительной активации TNFR1 in vitro, как было определено в анализе выхода IL-8 с помощью клеток HT1080 (фиг. 22e). В тех же условиях анализа, $IgG13.7_{half}$ ингибировал выход IL-8 из клеток HT1080, индуцированный 0,1 нМ растворимым TNF, с 1,8-кратным ростом величины IC_{50} при сравнении с Fab13.7 (фиг. 22f, табл. 12). Слияние Fab13.7 с мономерной частью Fc привело к улучшенному in vivo фармакокинетическому профилю. По сравнению с Fab13.7, исходное и конечное время полужизни, а также площадь под кривой of $IgG13.7_{half}$ увеличились на фактор, равный 3,7, 2,3 и 4,5, соответственно (фиг. 22g, табл. 12).

Пример 8. Моновалентный слитый белок Fab13.7-Fc.

Для преодоления ограниченного улучшения фармакокинетических свойств в случае $IgG13.7_{half}$, Fd и легкая цепь Fab13.7 были оба слиты с белковым фрагментом, состоящим из FcγR-выключенных доменов CH2 и CH3, содержавших дополнительные мутации, который способствовали гетеродимеризации с применением модификаций "выступы-во-впадины" (фиг. 23a, Merchant et al. 2013, $Fd13.7\text{-}Fc_{hole}$: SEQ ID NO: 30, $LC13.7\text{-}Fc_{knob}$: SEQ ID NO: 31). Коротко говоря, в дополнение к мутациям в CH1, шарнирной области и CH2, которые, как сообщалось, подавляли связывание с рецепторами Fcγ (Armour et al. 1999, Richter et al. 2013, Shields et al. 2001, Zettlitz et al. 2010), и выше описанным заменам цистеина серином в шарнирной области, вводили мутации T366S, L368A и Y407V в домен CH3, соединенный с фрагмент Fd, в то время как единственный остаток треонина домена CH3, соединенного с легкой цепью Fab13.7, заменяли на триптофан (T366W). Полученный таким способом $Fab13.7\text{-}Fc_{kih}0DS$ (Fab13.7 соединенный с Fc-частью с управляемой выступы-во-впадины [kih] гетеро-димеризацией и без дисульфидных [0DS] связей в шарнирной области) показал одну единственную полосу в SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях, соответствующую расчетной молекулярной массе 98 кДа для целого белка (фиг. 23b). В восстанавливающих условиях наблюдали две полосы, составляющие тяжелую и легкую цепь. Гель-фильтрационная хроматография подтвердила целостность структуры белка и отсутствие агрегированных или олигомеризованных фракций белка (фиг. 23c). $Fab13.7\text{-}Fc_{kih}0DS$ связывался с иммобилизованным человеческим слитым белком TNFR1-Fc в ELISA со сходной активностью по сравнению с немодифицированным Fab13.7 (фиг. 23d, табл. 12) и не показывал значительной активации TNFR1 in vitro, как было определено в анализе выхода IL-8 с помощью клеток HT1080 (фиг. 23e). В тех же условиях анализа, $Fab13.7\text{-}Fc_{kih}0DS$ ингибировал выход IL-8 из клеток HT1080, индуцированный 0,1 нМ растворимым TNF, с 2,3-кратным ростом величины IC_{50} при сравнении с Fab13.7. (фиг. 23f, табл. 12). Слияние Fab13.7 с гетеро-димерной частью Fc приводило к улучшенному in vivo фармакокинетическому профилю. По сравнению с Fab13.7, исходное и конечное время полужизни, а также площадь под кривой $Fab13.7\text{-}Fc_{kih}0DS$ увеличились на фактор 7,0, 8,9 и 21,3, соответственно (фиг. 23g, табл. 12).

Пример 9. Моновалентный слитый белок Fv13.7-Fc.

В другом формате, вариабельные домены (VH, VL) Fv13.7 были отдельно слиты с шарнирной областью цепей Fc (VH-шарнир-Fc(выступ) VL-шарнир-Fc(впадина)), как было описано для $Fab13.7\text{-}Fc_{kih}0DS$ (фиг. 24a, $VH13.7\text{-}Fc_{hole}$: SEQ ID NO: 32, $VL13.7\text{-}Fc_{knob}$: SEQ ID NO: 33). Полученный таким способом $Fv13.7\text{-}Fc_{kih}0DS$ показал одну единственную полосу в SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, с учетом обеих индивидуальных полипептидных цепей, который имели сходную молекулярную массу, приводящую в результате к рассчитанной MW, равной 98 кДа для целого белка (фиг. 24b). Гель-фильтрационная хроматография подтвердила целостность структуры белка и отсутствие агрегированных или олигомеризованных фракций белка (фиг. 24c). $Fv13.7\text{-}Fc_{kih}0DS$ связывался с иммобилизованным человеческим слитым белком TNFR1-Fc в ELISA со слабо увеличенной активностью по сравнению с немодифицированным Fab13.7 (фиг. 24d, табл. 12) и не показал значительной активации TNFR1 in vitro, как было определено в анализе выхода IL-8 с помощью клеток HT1080 (фиг. 24e). В тех же условиях анализа, $Fv13.7\text{-}Fc_{kih}0DS$ ингибировал выход IL-8 из клеток HT1080, индуцированный 0,1 нМ растворимым TNF, со сходной величиной IC_{50} при сравнении с Fab13.7. (фиг. 24f, табл. 12). Слияние Fv13.7 с гетеро-димерной частью Fc привело к улучшенному in vivo фармакокинетическому профилю. По сравнению с Fab13.7, исходное и конечное время полужизни, а также площадь под кривой of $Fv13.7\text{-}Fc_{kih}0DS$

увеличились на фактор, равный 4,1, 10,5 и 15,4, соответственно (фиг. 24g, табл. 12).

Настоящие данные продемонстрировали улучшенную антагоническую эффективность Fab13.7 по сравнению с ATROSAB и FabATR, происходящую из значительного снижения диссоциации комплекса антитело-рецептор. Поскольку сходные величины IC_{50} наблюдали для ATROSAB и FabATR в анализах выхода интерлейкина и цитотоксичности, присутствие только одного сайта связывания рецептора вместо двух, по-видимому, не уменьшает способность ингибировать TNF-опосредованную активацию TNFR1. Напротив, отсутствие второго сайта связывания для человеческого TNFR1 устраняет агонистическую эффективность, наблюдаемую в случае IgG13.7. Кроме того, никакой агонистической активности Fab13.7 не детектировали отдельно или в присутствии поликлональной козьей сыворотки, специфической для человеческого Fab, предназначенной для восстановления би- или мультивалентности путем опосредованного антителом перекрёстного сшивания. Это возможно указывает на сниженный риск связанных с воспалением побочных эффектов в in vivo ситуации, даже в случае иммунного ответа против лекарственных препаратов. И, наконец, в связи со сниженным размером и отсутствием FcRn-опосредованного рецикинга лекарственного препарата, Fab13.7 демонстрирует довольно короткое время циркулирования в крови, по сравнению с целой молекулой IgG. Реализация стратегии увеличения времени полужизни позволила преодолеть этот недостаток, подчеркнув, что потенциал Fab13.7 был модифицирован успешно для удовлетворения потребностей длительной циркуляции в человеческом организме, относительно будущего клинического применения.

Пример 10. Специфические материалы и способы стандартных анализов.

Материалы.

Конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) антитело против мышиных IgG (Fc специфическое), HRP-конъюгированные антитела против человеческих IgG (целая молекула, Fc специфические, Fab специфические), соответственно, были приобретены в компании "Sigma" (Тауфкирхен, Германия). HRP-конъюгированное антитело, нацеленное на His-tag антитела scFv приобретали в компании "Santa Cruz Biotechnology" (Санта-Крус, США). Клеточные линии человеческой рабдомиосаркомы Kym-1 выращивали в среде RPMI 1640, 10% FCS, 2 мМ L-глутамин, и клетки HT1080wt и клетки HeLa выращивали в среде RPMI 1640, 5% FCS, 2 мМ L-глутамин. Человеческий TNFR2-Fc слитый белок (Mohler et al. 1993, The Journal of Immunology 151. Jg., Nr. 3, S. 1548-1561). Химические соединения были приобретены в компании "Roth" (Карлсруэ, Германия), а ферменты (клонирование и ПЦР) и дополнительные реагенты приобретали в компании "ThermoFisher" (Мюнхен, Германия). Любой другой источник расходных материалов ясно указан ниже.

Экспрессия слитого белка TNFR1-Fc.

ДНК, кодирующую экстраклеточную область человеческого TNFR1 (aa 29-211), мышиного TNFR1 (aa 30-212) и мышиного TNFR2 (aa 23-258), получали синтетически (Geneart, Регенсбург, Германия) с помощью информации о последовательности из базы данных UniProtKB (Swiss-Prot), коды доступа: P19438 (человек (Homo sapiens) TNFR1) P20333 (человек (Homo sapiens) TNFR2) и P25119 (мышь (Mus musculus) TNFR2), вводя соответствующие сайты рестрикции между индивидуальными доменами и клонируя в pSecTagL1-Fc (модифицированный из pSecTag-FcHis, (Muller et al. J. Immunol. Methods (2008) 339(1): 90-8)). Клетки HEK293 трансфицировали ДНК-плазмидой с помощью липофектамина ("Invitrogen", Карлсруэ, Германия) и стабильно трансфицированные клоны отбирали в присутствии зеоцина, как описано (Muller et al. J. Biol. Chem (2007) 282(17): 12650-60). Клетки размножали в RPMI, 5% FCS, 2 мМ L-глутамин до 90% конфлюентности. Для продукции белка, среду заменяли на Opti-MEM I ("Invitrogen", Карлсруэ, Германия) и супернатант собирали каждые 3-4 дня. Белки очищали из супернатанта клеточной культуры, как описано ниже.

Экспрессия scFv-фрагментов антител в периплазме E.coli TG1.

Исходную культуру E. coli TG1, содержавшую экспрессионную плазмиду, инкубировали в течение ночи в 20 мл 2xTY (100 мкг/мл ампициллин, 1% глюкоза) при 37°C. На следующий день, в 1 литр 2xTY (100 мкг/мл ампициллин, 0,1% глюкоза) инокулировали 10 мл ночной культуры и инкубировали на качалке при 37°C до тех пор, пока OD [600 нМ] не достигала значения от 0,8 до 1,0. После добавления 1 мл IPTG (конечная концентрация 1 мМ) культуру инкубировали при комнатной температуре в течение дополнительных 3-4 ч. Бактерии собирали центрифугированием при 4500*g и осадок ресуспендировали в PPB до конечного объема 50 мл. Для освобождения фрагментов антител из периплазмы, добавляли 0,25 мл лизоцима (10 мг/мл в ddH_2O) и затем суспензию инкубировали на льду в течение 30 мин. До начала следующей стадии центрифугирования (1,000*g, 10 мин, 4°C) оставшиеся сферобласты стабилизировали добавлением 0,5 мл 1 М $MgSO_4$. Супернатант подвергали диализу в течение ночи при 4°C против PBS. Фрагменты антител очищали от раствора диализа дополнительной стадией центрифугирования (1000*g, 15 мин, 4°C), как описано ниже.

Экспрессия IgG13.7 и Fab3.7 после временной трансфекции.

Клетки HEK293 культивировали до тех пор, пока пять 175 $см^2$ флаконов не достигали 70-90% конфлуэнтности. 100 мкг ДНК-вектора и 250 мкл липофектамина исходно смешивали индивидуально, каждый с 7 мл Opti-MEM и затем смешивали друг с другом и инкубировали в течение 30 мин при RT.

Трансфекционную смесь доводили до объема 25 мл с помощью Opti-MEM, культуральную среду в каждом флаконе заменяли 5 мл трансфекционного раствора и клетки инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 4-6 ч. Продукцию начинали заменой трансфекционной среды 50 мл Opti-MEM, которую заменяли каждый второй день, пока не собирали, по меньшей мере, один литр. Супернатанты стерильно фильтровали и очищали, как описано ниже.

Очистка белка - аффинная хроматография на иммобилизованных ионах металла (IMAC).

Стерильно отфильтрованные супернатанты культуры ткани или отдиализованные периплазматические экстракты инкубировали с Ni-NTA (Ni-NTA Agarose, 64-17-5, Macherey-Nagel, Дюрен, Германия) на качалке при 4°C в течение ночи. Для сбора чистой смолы гранулы, содержавшие супернатанты, загружали в хроматографическую колонку Poly-Prep® самотеком или под умеренным давлением вакуума. Промывание выполняли с помощью буфера IMAC, содержавшего 20 мМ имидазол, до тех пор, пока практически в элюате нельзя было обнаружить никакого белка с помощью сопутствующего теста Брэдфорд (90 мкл Брэдфорд реагент (500-0006, BIO-RAD, Мюнхен, Германия) + 10 мкл образца смешивали в 96-луночном планшете для микротитрования). Белок элюировали со смолы 250 мМ имидазолом в буфере IMAC и собирали фракции по 500 мкл. Белок, содержавший фракции (определенны быстрым тестом Брэдфорд, как описано), объединяли и диализовали против PBS.

Очистка белка - аффинная хроматография антитела и белка А.

Процедуру выполняли в точности, как описано для IMAC, с помощью или смолы TOYOPEARL® AFrProtein A-650F (смола на основе белка А, 22805, "Tosoh", Штутгарт, Германия) или смолы HiTrap KappaSelect (селективные фрагменты каппа-цепи антител, конъюгированные с агарозной матрицей, 17-5458-12, "GE Healthcare", Chalfont St Giles, GB). Промывку выполняли с помощью PBS и белки элюировали со смолы 100 мМ глицином при pH 2-3. Элюированные фракции непосредственно объединяли и сразу же диализовали против PBS.

Препаративная гель-фильтрационная хроматография.

В случае агрегированных или собранных в мультимерные ансамбли белков в лекарственных препаратах, осуществляли дополнительную стадию гель-фильтрации с помощью системы очистки "Akta purifier". Белки разделяли на колонке с Superdex 200 10/300 GL со скоростью элюции, равной 0,5 мл/мин с помощью PBS в качестве жидкой фазы. Фракции по 200 мкл регистрировали и пик, содержавший образцы, объединяли для дополнительных экспериментов.

Характеристика белка - полиакриламидный гель-электрофорез (SDS-PAGE).

SDS-PAGE выполняли строго в соответствии с Laemmli 1970, применяя 3 мкг препаратов белка и указанное процентное содержание концентрирующего и разделяющего геля.

Характеристика белка - гель-фильтрационная хроматография (SEC).

Для определения гидродинамического радиуса, 30 мкг очищенных белковых образцов анализировали с помощью Waters 2695 HPLC в комбинации с колонкой Phenomenex Yarra SEC-2000 (300×7,8 мм, скорость элюции 0,5 мл/мин). Мобильная фаза представляла собой 0,1 М Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, 0,1 М Na_2SO_4, pH 6,7. Применяли следующие стандартные белки: Тироглобулин (669 кДа), апоферитин (443 кДа) алкогольдегидрогеназа (150 кДа), БСА (66 кДа), карбоангидраза (29 кДа), FLAG-пептид (1 кДа).

Характеристика белка - термостабильность, определенная с помощью динамического рассеяния света

Стабильность к повышению температуры измеряли с помощью динамического рассеяния света, применяя систему ZetaSizer Nano ZS ("Malvern", Херренберг, Германия). Около 100 мкг очищенных белковых образцов доводили до общего объема 1 мл, применяя PBS, и вносили в кварцевую кювету. Измеряли тысячу импульсов в секунду (kcps), что указывало на размер денатурированных белковых частиц в растворе, который увеличивался при агрегации белка при нагревании. Температуру увеличивали ступенчато от 35°C до 80°C (интервалы в 1°C, 2 мин уравновешивания перед каждым измерением).

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Микротитровальные планшеты покрывали 100 мкл указанных белков (1 мкг/мл в PBS, смотри табл. 3.3) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Оставшиеся сайты связывания блокировали 2% MPBS (снятое молоко в PBS, 200 мкл на лунку) при комнатной температуре в течение 2 ч и в дальнейшем промывали дважды PBS. 100 мкл образцов разводили в 2% MPBS, инкубировали при комнатной температуре в течение 1-го часа перед последней стадией инкубации с 100 мкл антител, конъюгированных с HRP для детекции, в 2%-ном MPBS. В случае экспериментов по конкуренции, оба проанализированных белковых образца получали индивидуально (или титровали, или разводили до одной концентрации) и смешивали перед нанесением их на планшет. Связавшийся белок детектировали со 100 мкл раствора субстрата TMB, HRP-реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М H_2SO_4 и поглощение на длине волны 450 нМ измеряли с помощью микропланшетного ридера ""Infinite"" (TECAN, Мэннедорф, Швейцария). Между каждой из стадий инкубации и перед детекцией, планшеты промывали три раза PBST и дважды PBS.

Измерения аффинности с помощью пьезокварцевого микровзвешивания.

Динамику связывания в реальном времени в белок-белковых взаимодействиях определяли с помощью измерения пьезокварцевого микровзвешивания (A-100 C-Fast или Cell-200 C-Fast, Attana, Сток-

гольм, Швеция). Один из партнеров связывания (лиганд, например, TNFR1-Fc) был химически иммобилизован на карбоксильном сенсорным чипе в соответствии с протоколом производителя при других плотностях (около 200 Гц в случае насыщающих условий для подтверждения ранее опубликованных результатов и 50-100 Гц, в особенности при примерно 50 Гц, для установления условий низкой плотности рецепторов, лучше напоминающих ситуацию на клеточной поверхности). Эксперименты по связыванию выполняли с образцами (аналитами), разведенными в PBST (PBS, 0,1% Tween 20) при pH 7,4 со скоростью элюции 25 мкл/мин при 37°C. Чип регенерировали 25 мкл 5 мМ NaOH или 20 мМ глицином, pH 2,0. Каждое третье измерение, измеряли впрыскивание электродного буфера, который вычитали из кривой связывания. Данные регистрировали с помощью программного обеспечения, предоставленного Attana для определенного устройства, и анализировали с помощью программного обеспечения Attache Office Evaluation software (Attana, Стокгольм, Швеция) и TraceDrawe (ridgview instruments, Ванге, Швеция).

Анализ цитотоксичности Kym-1.

Клетки Kym-1 (1×10^4 на лунку) высевали в 96-луночные планшеты для микротитрования и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO_2. Белки разводили в RPMI 1640 + 10% FCS. Когда два вида белка применяли вместе в экспериментах по конкуренции, то оба образца получали индивидуально (или титровали, или разводили до одной концентрации) и смешивали перед нанесением их на планшет. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 24 ч перед отбрасыванием супернатанта и к клеткам добавляли 50 мкл раствора кристаллического фиолетового. В дальнейшем, планшеты промывали в ddH_2O 20 раз и высушивали. Оставшийся фиолетовый краситель, полученный от живых и прикрепившихся клеток, которые фиксировали метанолом, содержавшемся в растворе для окрашивания, растворяли добавлением 100 мкл метанола при встряхивании при RT в течение 10 мин. Планшеты измеряли с помощью микропланшетного ридера "Infinite" (Tecan, Мэннедорф, Швейцария).

Анализ выхода интерлейкина.

2×10^4 клеток HeLa или HT1080 на лунку высевали в 96-луночный планшет для микротитрования и выращивали в 100 мкл RPMI 1640 + 5% FCS в течение ночи. На следующий день, супернатанты заменяли для удаления конститутивно полученных цитокинов. Клетки инкубировали с сериями разведений образцов в RPMI 1640 + 5% FCS при 37°C, 5% CO_2. В случае экспериментов по конкуренции, оба анализируемых образца белка получали индивидуально (или титровали, или разводили до одной концентрации) и смешивали перед нанесением их на планшет. Нестимулированные клетки служили контролем. Через 16-20 ч, планшеты центрифугировали при 500 g в течение 5 мин и клеточные супернатанты анализировали непосредственно с помощью ELISA, который выполняли в соответствии с протоколом изготовителя. Супернатанты разводили в RPMI 1640 (без FCS) и антитела разводили в Reagent Diluent (0,1% BSA, 0,05% Tween 20, 20 мМ TRIS, 150 мМ NaCl, pH7,5). Покрытые планшеты для микротитрования блокировали с помощью 2% BSA (бычий сывороточный альбумин) в PBS и промывку, а также детекцию и измерение выполняли, как описано выше для ELISA. Наборы для сэндвич-ELISA для детекции IL-6 и IL-8 в супернатанте клеточной культуры были приобретены в компании "ImmunoTools" (Фризойте, Германия).

Фармакокинетика.

Трансгенным мышам C57BL/6J, которые несли ген экстраклеточного домена человеческого TNFR-1 в локусе определенного мышиного гена (C57BL/6J-huTNFRSF1Aecdtm1UEG/izi) вводили внутривенно от 12 до 25 мкг анализируемых белков. C57BL/6J с неизмененным генетическим основанием служили контролем. Образцы крови регистрировали через 3 мин, 30 мин, 1 час, 3 часа и 6 ч, а также через 3 дня и 7 дней и сразу же инкубировали на льду. Сыворотку отделяли центрифугированием (13,000 g, 4°C, 10 мин) и хранили при -20°C. Оставшийся в сыворотке белок определяли с помощью связывания ELISA, как описано выше. Данные представляли как процентное содержание от 3-минутного значения. Альтернативно, сигнал ELISA в момент инъекции интерполировали из полученных кривых и устанавливали на исходную концентрацию in vivo на основе введенной дозы и среднего объема крови мышей, и получали в результате указанные концентрации во временных точках измерения.

Фаговый дисплей - клонирование акцепторного вектора pHENIS_scFvIG11-fsSTOP.

Последовательность ДНК, кодирующую scFvIG11, амплифицировали с помощью ПНР (описано выше) из матрицы pHENIS-scFvL2a_huBR6_IG11 (Zettlitz 2010b) с помощью праймеров: обратного NcoI_VHIZI06.1_back и прямого BstZ17I_fsSTOP_ BssHII_for. Полученый фрагмент ДНК, содержавший сдвиг рамки в комбинации с остановкой кодона, был вставлен снова в pHENIScFvL2a_huBR6_IG11 после переваривания с NcoI и BstZ17I, в результате был получен акцепторный вектор pHEMS_scFvIG11-fsSTOP.

Фаговый дисплей - создание библиотеки отбора EP03.

Библиотеку отбора EP03 для созревания аффинности scFvIG11, приводящую в результате к scFvT12B, получали ПЦР с внесением ошибок с помощью набора для случайного мутагенеза GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (200550, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, США) в соответствии протоколом производителей. Матричную ДНК pHENIS-scFvLib2a_huBR6_IG11 амплифицировали применяя праймеры LMB2 и fdSeq1. Предназначенную для генерации умеренной частоты мутаций, 0,1 мкг матричную ДНК применяли в 30 циклах ПЦР-реакции. Полученный ПЦР-продукт клонировали в акцептор-

ный вектор pHENISscFvIG11_ fsSTOP после переваривания с помощью ферментов NcoI и NotI. Лигирование выполняли в течение ночи при 16°C. На следующий день, лигированную ДНК осаждали добавлением 1/10 объема смеси лигирования (LMV) 3 M NaAc pH 5,2, 5 мкл гликоген (20 мкг/мкл) и 2,7 LMV 100% этанол. После 1 часа инкубация при -80°C, ДНК центрифугировали (13,000*g, RT, 5 мин) и высушенный на воздухе осадок ресуспендировали в 40 мкл ddH_2O и замораживали снова при -20°C в 2-4 мкл аликвотах. 3.18.3. Получение электрокомпетентных E. coli TG1. Переносили 5 мл ночной культуры E. coli TG1, выращенной в среде SOB (содержавшей 1% глюкозу), в 500 мл свежей SOB, культуру инокулировали и выращивали до тех пор, пока OD [600 нМ] не достигала значения 0,5-1,0. Затем клетки охлаждали на льду в течение, по меньшей мере, 15 мин и собирали центрифугированием (2000 *g, 4°C, 15 мин). Осадок клеток мягко ресуспендировали в 200 мл ледяной холодной ddH_2O (исходно с помощью 20 мл, затем еще 180 мл добавляли после ресуспендирования). Цикл центрифугирование/ресуспендирование повторяли второй раз в точности как описано, затем ресуспендированные клетки хранили на льду в течение 30 мин и снова центрифугировали (2000*g, 4°C, 15 мин). Бактерии ресуспендировали в 50 мл 10%-ного глицерола, инкубировали на льду в течение еще 30 мин и собрали снова центрифугированием (1500*g, 4°C, 15 мин). Полученный осадок ресуспендировали до конечного объема 500-1000 мкл, хранили на льду и применяли непосредственно для электропорации.

Фаговый дисплей - электропорация E. coli TG1.

Электрокомпетентные E. coli TG1 (StrataGen, Kirkland, WA, США) были получены перед экспериментом и 40 мкл клеточной суспензии смешивали с замороженной аликвотой лигированной ДНК. После 1 мин инкубации на льду, смесь ДНК с бактериями переносили в кювету для электропорации (BIO-RAD, Мюнхен, Германия) и немедленно подвергали электропорации (17 кВт/см, 200 Ω, 25 мкФ, GenePulser® XCell, BIO-RAD, Мюнхен, Германия). Затем, трансформированные клетки спасали путем промывки кюветы с 1 мл LB, переносили в культуральную пробирку и инкубировали на качалке при 37°C в течение 1-го часа, перед высеванием на планшеты с агаром LBamp. Для целей контроля, 10 мкл, 1 мкл и 0,1 мкл трансформированного образца высевали отдельно на планшеты с агаром LBamp, а также 2,5 мкл электропорационных образцов, содержавших или 2 мкл ddH_2O или 1 мкл pUC ДНК (0,1 нг/мкл) смешивали с компетентными клетками.

Фаговый дисплей - получение фагов-помощников.

E. coli TG из ночной культуры, которую начинали с бактерий, недавно посеянных штрихом на минимальном планшете, применяли для инокуляции 500 мл 2xTY культуры (OD [600 нМ] 0,05-0,07). При OD [600 нМ], равной от 0,4 до 0,5, добавляли 1 мл VSC M13 фагов-помощников (StrataGen, Kirkland, WA, США) и культуру инкубировали 30 мин без перемешивания на качалке при 37°C и еще в течение 30 мин, на качалке при 37°C. Затем, канамицин добавляли до конечной концентрации 30 мкг/мл и культуру инкубировали на качалке при 30°C в течение ночи. Наконец, бактерии отделяли центрифугированием (4000*g, 45 мин, RT) и содержавший фаги супернатант хранили при -20°C в 1 мл аликвотах.

Фаговый дисплей - спасение и осаждение фага.

Трансформированные бактерии, зарегистрированные на планшетах с LB-агаром и 50 мл 2xTY (2% глюкоза, 100 мкг/мл ампициллин), инокулировали до исходной OD [500 нМ], равной 0,05-0,07. Когда культура после инкубации на качалке при 37°C достигала OD [600 нМ], равную 0,4-0,5, добавляли 1 мл фагов-помощников VSC M13 и культуру инкубировали при 37°C сначала без качалки (30 мин) и затем на качалке (30 мин). Затем, бактерии собирали центрифугированием (4000*g, RT, 15 мин), ресуспендировали в 50 мл свежей 2xTY, содержавшей 100 мкг/мл ампициллин и 30 мкг/мл канамицина и инкубировали на качалке при 30°C в течение ночи. На следующий день, бактерии центрифугировали (4000*g, RT, 30 мин) и добавляли 10 мл 20% PEG6000 к 40 мл супернатанта, мягко перемешивали и перемешивали на качалке 4°C в течение 1 ч. После центрифугирования (4000*g, RT, 30 мин) осажденные фаги растворяли в 1 мл PBS и снова центрифугировали 13000*g и RT в течение 10 мин. Свободный от бактерий супернатант, содержавший амплифицированные фаги, применяли немедленно для отбора (или хранили при 4°C для дальнейшего применения).

Фаговый дисплей - отбор в иммунопробирке.

Иммунопробирки покрывали человеческим TNFR1-Fc или человеческим TNFR2-Fc в концентрации, снижающейся с каждым раундом отбора (раунда отбора 1:1 и 0,1 мкг/мл, раунда отбора 2: 0,1 и 0,01 мкг/мл, и т.д.; всегда покрывали 2 мкг/мл huTNFR2). Пробирки блокировали 2% MPBS. 1 или 10 мкл осажденных фагов добавляли к 1 мл 2% MPBS и инкубировали в покрытых человеческим TNFR2-Fc пробирках для устранения кросс-реактивных фагов. Данный отрицательный отбор выполняли исключительно перед начальным этапом отбора. После 1-го часа инкубации при RT, супернатант переносили в иммунопробирки, покрытые человеческим TNFR1-Fc, и инкубировали в течение дополнительного часа. Начиная с раунда отбора 2, растворимый человеческий TNFR1-Fc добавляли в иммунопробирку в конечной концентрации 5 мкг/мл с целью захватить быстро диссоциирующие фаги и препятствовать их связыванию с иммобилизованными рецепторами. Супернатант затем отбрасывали и пробирки промывали 10 раз PBST (0,1% Tween 20) и 10 раз PBS. Фаги элюировали 1 мл 100 мМ TEA (триэтиламин) после инкубации в течение 7 мин. Элюированные фаги нейтрализовали немедленно с помощью 500 мкл 1 M Tri-

sHCl буфера (pH 7,5) и добавляли к 8,5 мл E.coli TG1 ранней логарифмической фазы. Инкубацию выполняли, как было описано выше, для трансдукциия (37°C, отстаивали, 30 мин; 37°C, на качалке, 30 мин). Бактерии отделяли центрифугированием (4000*g, RT, 10 мин) и высевали на планшеты LBamp.

Фаговый дисплей - биотинилирование слитых белков рецептор-Fc.

Человеческий TNFR1-Fc и человеческий TNFR2-Fc биотинилировали при смешивании образцов белка с 20-кратным молярным избытком сульфо-NHS-SS-биотина (Pierce, Rockford, США) и инкубировали при RT в течение 2 ч. Оставшийся свободный сульфо-NHS-SS-биотин удаляли из образца диализом против PBS при 4°C в течение ночи. Успешное биотинилирование TNFR1-Fc и TNFR2-Fc тестировали в стандартном связывающем ELISA с иммобилизованным TNF. Связавшиеся слитые белки рецептор-Fc детектировали с помощью PolyHRP-Strep. ELISA выполняли, как описано выше.

Фаговый дисплей - равновесный отбор на магнитных Dynabeads.

С целью удаления фагов, связавшихся с человеческим TNFR2 или слитым Fc-фрагментом кроссреактивным образом, 1 мкл или 10 мкл осажденных фагов добавляли к 1 мл 2% MPBS, содержавшему 0,1 мкМ человеческого TNFR2-Fc и инкубировали на качалке при RT в течение 1-го часа. Затем, 50 мкл магнитных покрытых стрептавидином Dynabeads добавляли к смеси для отбора и перемешивали еще 5 мин. Гранулы затем отделяли помещением 2 мл реакционной пробирки в магнитное устройство (DYNAL® MPC®-S, Life Technologies, Carlsbad, CA, США), смесь для отбора переносили в новую 2 мл реакционную пробирку и добавляли человеческий TNFR1-Fc к смеси для отбора (раунда отбора 1:10 нМ/1 нМ, раунда отбора 2:1 нМ/0,1 нМ, раунда отбора 3: 0,1 нМ/0,01 нМ). После инкубация при RT (перемешивание в течение 1-го часа) 10 мкл Dynabeads добавляли к смеси для отбора и инкубировали и отделяли так, как описано для отрицательного раунда отбора с человеческим TNFR2-Fc. Супернатант отбрасывали и 1 мл 10 мМ DTT (дитиотреитола) добавляли к гранулам для освобождения связанных фагов от антигена. Трансдукцию выполняли, как описано для отбора в иммунопробирках.

Фаговый дисплей - ELISA для поликлональных фагов.

Изменения связывания пула фагов в целом тестировали с помощью поликлонального фагового ELISA. Экспериментальная процедура описана в разделе ELISA, здесь антиген, который подвергали отбору фаговым дисплеем, применяли для покрытия. 10 мкл осажденных фагов перемешивали с 90 мкл 2%-ного MPBS, наносили на планшет для микротитрования и связанные фаги детектировали с помощью анти-M13-HRP антитела (27942101, GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB).

Фаговый дисплей - скрининг отборов фагового дисплея.

В 100 мкл 2xTY LBamp на лунку от 1 до 4 планшетов для микротитрования инокулировали одиночные клоны (от 100 до 400 колоний), которые были отобраны из планшетов после трансдукции финального раунда отбора, и инкубировали на качалке при 37°C. Когда помутнение становилось заметно, добавляли 25 мкл LB, содержавшего фагов-помощников VCS M13 (1 мл на планшет для микротитрования), и инкубировали в течение трансдукции как описано. Затем, 25 мкл LB, содержавшего 240 мкг/мл канамицина (конечная концентрация 30 мкг/мл), добавляли к планшету для микротитрования и планшет инкубировали при 30°C, на качалке в течение ночи. На следующий день, бактерии отделяли центрифугированием (500*g, RT, 5 мин) и супернатанты перемешивали 1:1 с 2% MPBS и анализировали с помощью ELISA, как описано для поликлонального фагового ELSIA, или в одной точке измерения, или титровали.

Фаговый дисплей - скрининг скоростей диссоциации супернатантов культуры бактерии, содержавшей фагов.

Константа скорости диссоциации scFv-несущих фагов определяли скринингом скорости диссоциации, с помощью технологии QCM. Спасение фагов выполняли по сходному с описанным протоколом, однако он был уменьшен до 5 мл LB-культуры. 100 мкл ночной культуры (или очищенный препарат scFv) применяли для инокуляции и фагов-помощников VSC M13 добавляли, когда культуры демонстрировали видимое помутнение. Следующие шаги выполняли, как выше указано. Без преципитации, супернатанты, содержавшие фаги, разводили 1:2 в PBST (0,1% Tween 20) и наносили на сенорный чип, иммобилизованный с huTNFR1-Fc при умеренной плотности (48 Гц). Подвижный буфер смешивали 1:1 с LB, а также для минимизации эффектов буфера. Среднюю величину из трех измерений анализировали с помощью программного обеспечения Attache office software (Attana, Стокгольм, Швеция).

Связывание Fab13.7 с полиэтиленгликолем.

Fab13.7 с модифицированным цистеином (Fab13.7') связывали с метокси-PEG40 кДа 2 малеимидом (mPEG-Mal). За один день, белки восстанавливали добавлением TCEP (Tris(2-карбоксиэтил)фосфин, f.c. 5 мМ) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем TCEP удаляли с помощью диализа в трубках D-Tube™ Dialyzer Mini (порог отсечения MW 6-8 кДа) против насыщенного азотом буфера 1x Nellis (10 мМ Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 буфер, 0,2 мМ EDTA, 30 мМ NaCl, pH 6,7) в течение ночи при 4°C с помощью магнитной мешалки. Восстановленный Fab13.7' смешивали с mPEG-Mal в молярном отношении 1:10 (белок: mPEG-Mal) и инкубировали в течение 1-го часа при комнатной температуре. На инкубацию наслаивали азот, для того чтобы избежать повторного окисления Fab13.7'. Наконец, свободные и реактивные малеимидные группы тушили добавлением L-цистеина (f.c. 100 мкМ) в течение 10 мин при комнатной температуре.

Ссылки

Abhinandan KR, Martin AC. Analyzing the "degree of humanness" of antibody sequences. J Mol Biol. 2007 369(3):852-62.

Richter F, Liebig T, Guenzi E, Herrmann A, Scheurich P, Pfizenmaier K, Kontermann RE. Antagonistic TNF receptor one-specific antibody (ATROSAB): receptor binding and in vitro bioactivity. PLoS One. 2013 8(8):e72156. doi: 10.1371/journal.pone.0072156. eCollection 2013.

Zettlitz KA, Lorenz V, Landauer K, Münkel S, Herrmann A, Scheurich P, Pfizenmaier K, Kontermann R. ATROSAB, a humanized antagonistic anti-tumor necrosis factor receptor one-specific antibody. MAbs. 2010 2(6):639-47.

Armour KL, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM. Recombinant human IgG molecules lacking Fcgamma receptor I binding and monocyte triggering activities. Eur J Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24.

Choy EH, Hazleman B, Smith M, Moss K, Lisi L, Scott DG, Patel J, Sopwith M, Isenberg DA. Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF fragment (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis: a phase II double-blinded, randomized, dose-escalating trial. Rheumatology (Oxford). 2002 Oct;41(10):1133-7.

Gu J, Yang J, Chang Q, Liu Z, Ghayur T, Gu J. Identification of Anti-EGFR and Anti-ErbB3 Dual Variable Domains Immunoglobulin (DVD-Ig) Proteins with Unique Activities. PLoS One. 2015; 10(5): e0124135. Published online 2015 May 21. doi: 10.1371/journal.pone.0124135

Merchant M, Ma X, Maun HR, Zheng Z, Peng J, Romero M, Huang A, Yang NY, Nishimura M, et al. Monovalent antibody design and mechanism of action of onartuzumab, a MET antagonist with anti-tumor activity as a therapeutic agent Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 August 6; 110(32): E2987–E2996. Published online 2013 July 23. doi: 10.1073/pnas.1302725110

Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. J Biol Chem. 2001 Mar 2;276(9):6591-604. Epub 2000 Nov 28.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор рецептора huTNFR1, который представляет собой человеческую или гуманизированную конструкцию антитела, которое моновалентно узнает huTNFR1 через антигенсвязывающий фрагмент, в которой антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который включает CDR-последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельный домен легкой цепи (VL), который включает CDR-последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, в которых:

a) CDRH1 последовательность определяют как SEQ ID NO: 1;

b) CDRH2 последовательность определяют как SEQ ID NO: 10, где X в положении 5 является S;

c) CDRH3 последовательность определяют как SEQ ID NO: 3;

d) CDRL1 последовательность определяют как SEQ ID NO: 4;

e) CDRL2 последовательность определяют как SEQ ID NO: 5; и

f) CDRL3 последовательность определяют как SEQ ID NO: 11

2. Ингибитор по п.1, в котором конструкцию антитела выбирают из группы, состоящей из Fab-молекул, scFv-молекул, дисульфид-стабилизированных Fv (dsFv) антитела полу-IgG1 и Fv-доменов,.

3. Ингибитор по п.2, в котором конструкция антитела представляет собой любой из Fab, scFv, dsFv, или Fv доменов, который слит с Fc-фрагментом антитела.

4. Ингибитор по любому из пп.1-3, в котором конструкция антитела модифицирована путем связывания с полиэтиленгликолем (PEGилирована), гликозилированным PEG, гидроксиэтилкрахмалом (HESилирована) или полисиаловой кислотой (PSAилирована).

5. Ингибитор по любому из пп.1-4, в котором:

a) домен VH включает или состоит из последовательности SEQ ID NO: 13, или ее функционально активного варианта, имеющего по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 13; и

b) домен VL включает или состоит из последовательности SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO:19, или их функционально активного варианта, имеющего по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

6. Ингибитор по любому из пп.1-4, включающий комбинацию доменов VH и VL, которую выбирают из:

i) комбинации, где

VH включает или состоит из SEQ ID NO: 13, и

VL включает или состоит из SEQ ID NO: 17; или

ii) комбинации, где

VH включает или состоит из SEQ ID NO: 13, и

VL включает или состоит из SEQ ID NO: 19.

7. Ингибитор по любому из пп.1-6, в котором антигенсвязывающий фрагмент связывает huTNFR1 с K_D менее чем 5×10^{-9} M и k_{off} менее чем 10^{-3} c^{-1}, как определено для Fab-формата путем пьезокварцевого микровзвешивания (QCM) при 37°C.

8. Ингибитор по любому из пп.1-7, в котором конструкция антитела имеет увеличенную термостабильность, равную по меньшей мере 60°C, как определено с помощью динамического рассеяния света.

9. Фармацевтический препарат, включающий ингибитор по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Способ получения ингибитора по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что для экспрессии конструкции антитела используют рекомбинантную систему экспрессии в млекопитающих.

11. Применение ингибитора по любому из пп.1-8 в лечении субъекта, представляющего собой человека, страдающего от заболевания, при котором показаны анти-TNF терапии или небиологические модифицирующие течение заболевания противоревматические лекарственные средства (DMARD).

12. Применение по п.11, в котором субъект вырабатывает антитела против лекарственных препаратов.

13. Применение по п.11, в котором субъект страдает от любого из:

a) острого или хронического воспаления суставов, кожи и кишечника; и/или

b) аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита, ювенильного артрита, анкилозирующего спондилита, болезни Крона, рассеянного склероза, застойной сердечной недостаточности, метаболических заболеваний, синдрома выброса цитокинов, септического шока, острого и хронического нейродегенеративного заболевания, инсульта, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, язвенного колита, панкреатита, ХОБЛ, острых молниеносных вирусных или бактериальных инфекций, хронических нейродегенеративных заболеваний, генетически унаследованных заболеваний с TNF/TNFR1 в качестве причинного патологического медиатора, синдрома периодической лихорадки, херувизма или рака.

14. Лекарственный препарат для лечения субъекта, представляющего собой человека, нуждающегося в анти-TNF терапии, содержащий эффективное количество ингибитора по любому из пп.1-8.

15. Лекарственный препарат по п.14, в котором субъект страдает от заболевания, при котором показаны анти-TNF терапии или небиологические терапевтические средства DMARD.

16. Лекарственный препарат по п.14, в котором субъект вырабатывает антитела против лекарственных средств.

17. Лекарственный препарат по п.14, в котором субъект страдает от любого из:

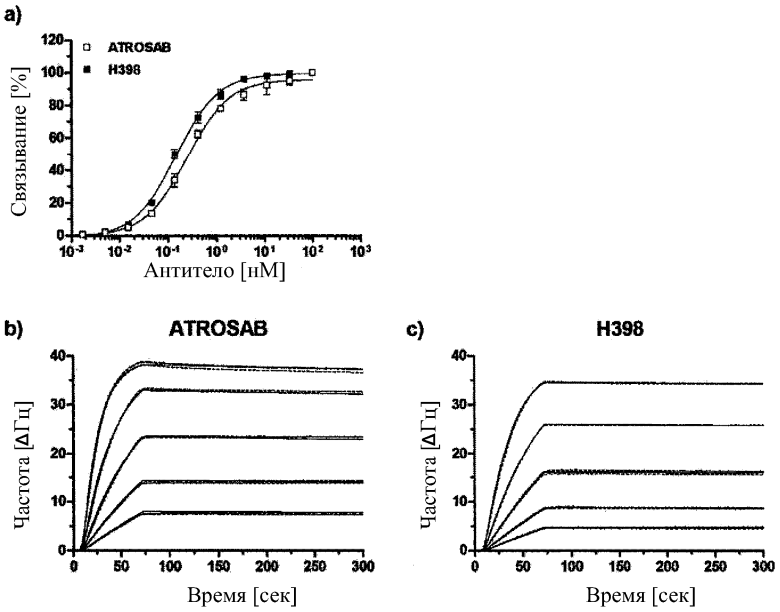
a) острого или хронического воспаления суставов, кожи и кишечника; и/или

b) аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита, ювенильного артрита, анкилозирующего спондилита, болезни Крона, рассеянного склероза, застойной сердечной недостаточности, метаболических заболеваний, синдром выброса цитокинов, септического шока, острого и хронического нейродегенеративного заболевания, инсульта, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, язвенного колита, панкреатита, ХОБЛ, острых молниеносных вирусных или бактериальных инфекций, хронических нейродегенеративных заболеваний, генетически унаследованных заболеваний с TNF/TNFR1 в качестве причинного патологического медиатора, синдрома периодической лихорадки, херувизма или рака.

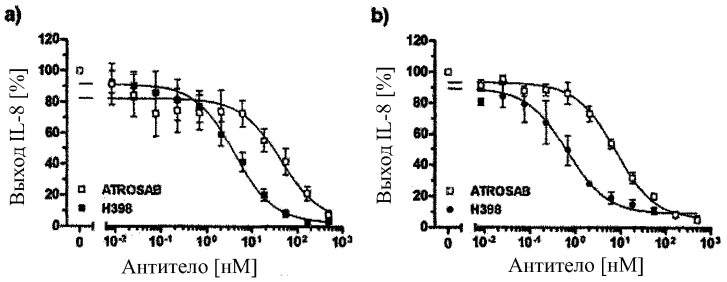
18. Изолированная нуклеиновая кислота, кодирующая ингибитор по любому из пп.1-8.

19. Вектор экспрессии, включающий нуклеиновую кислоту по п.18.

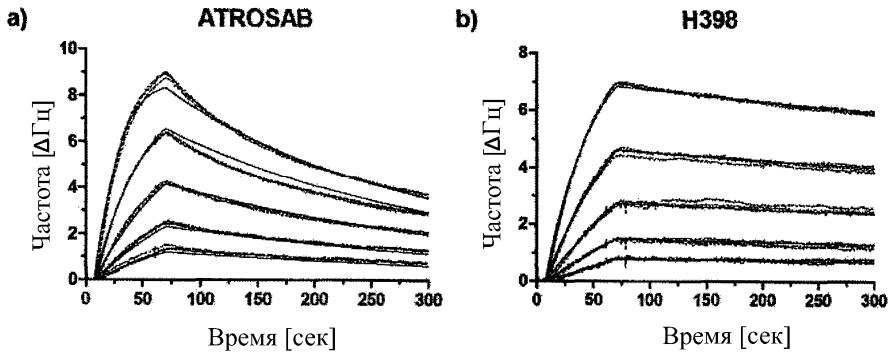
20. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая нуклеиновую кислоту по п.18.



Фиг. 1

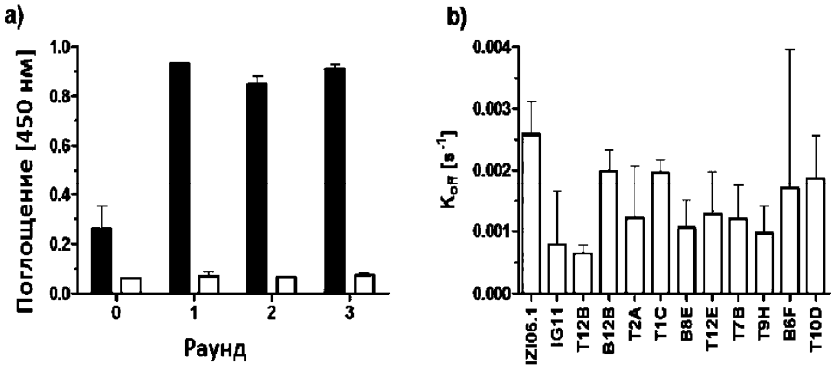


Фиг. 2

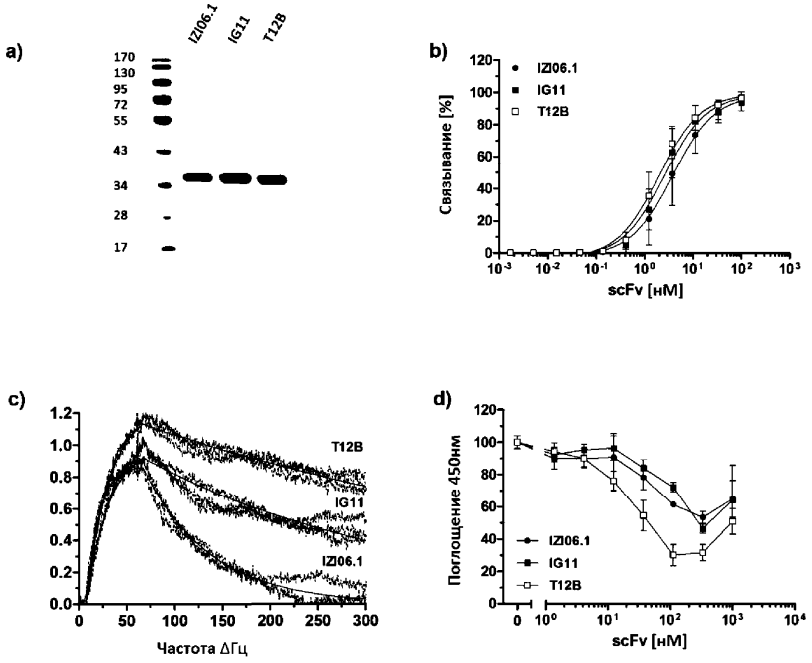


Фиг. 3

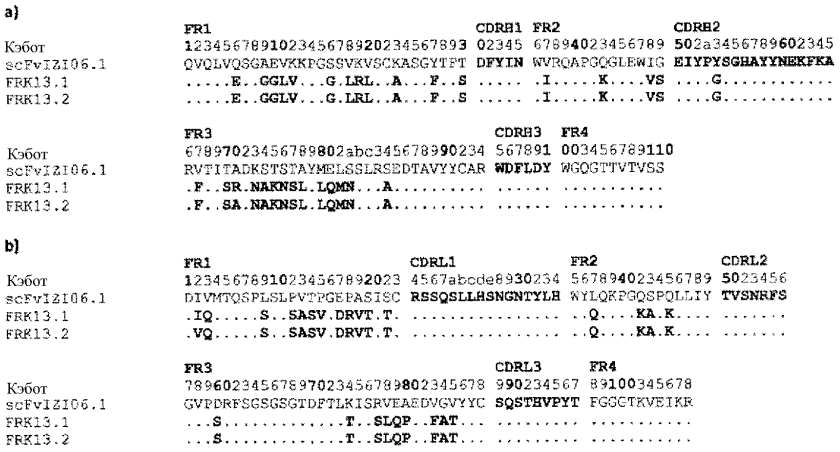
Фиг. 4



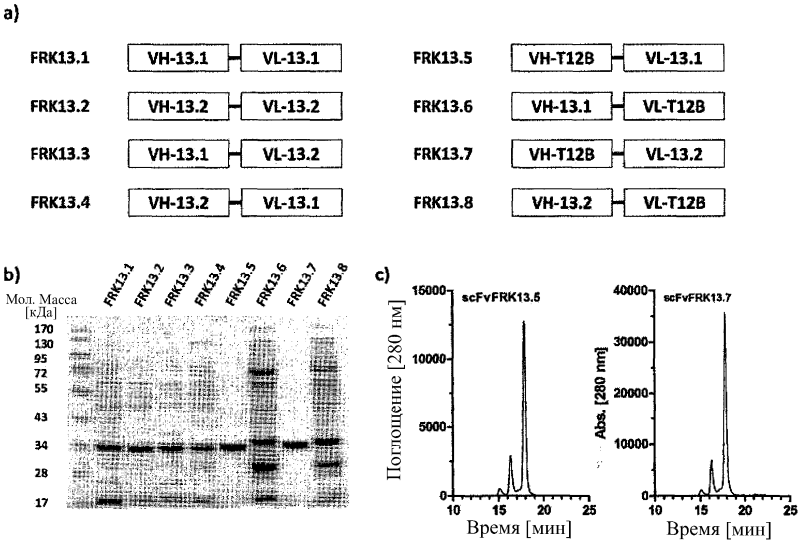
Фиг. 5



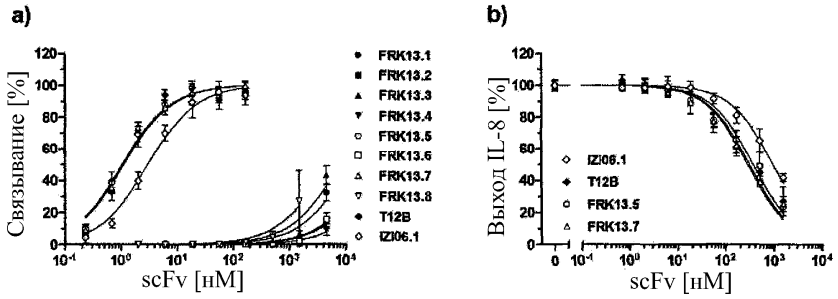
Фиг. 6



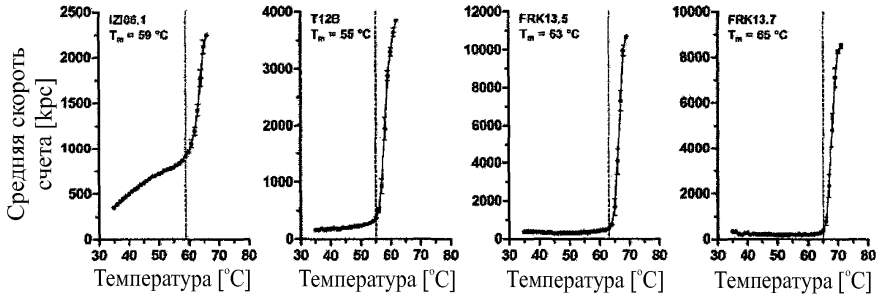
Фиг. 7



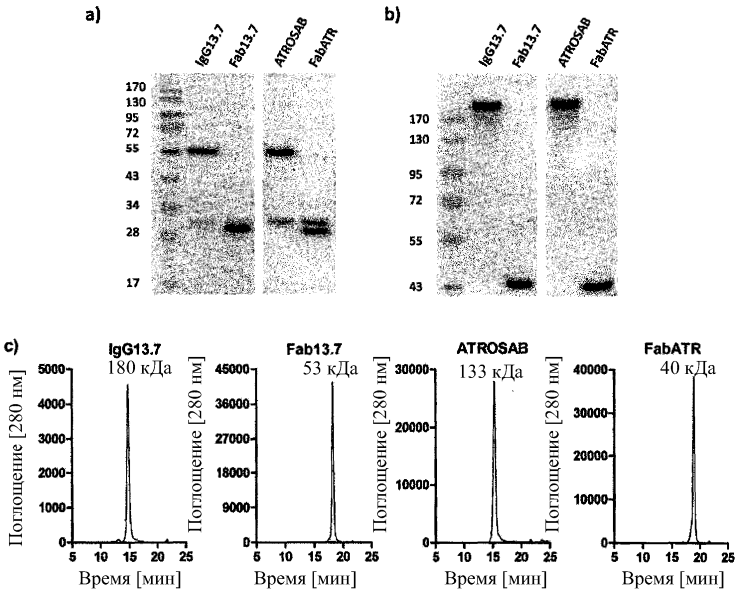
Фиг. 8



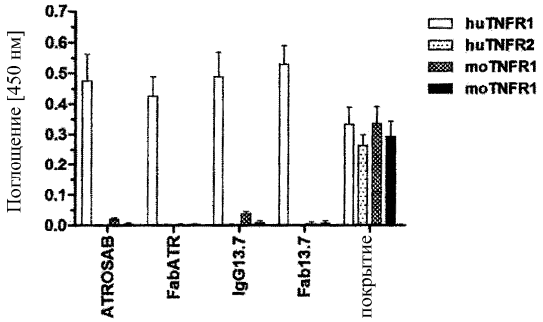
Фиг. 9



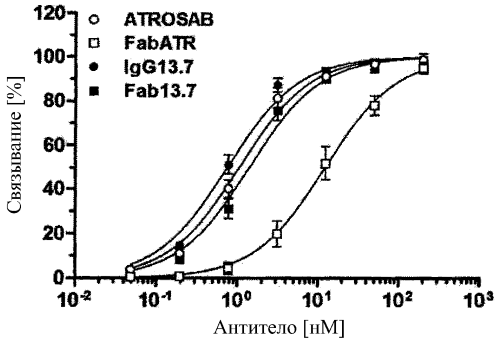
Фиг. 10



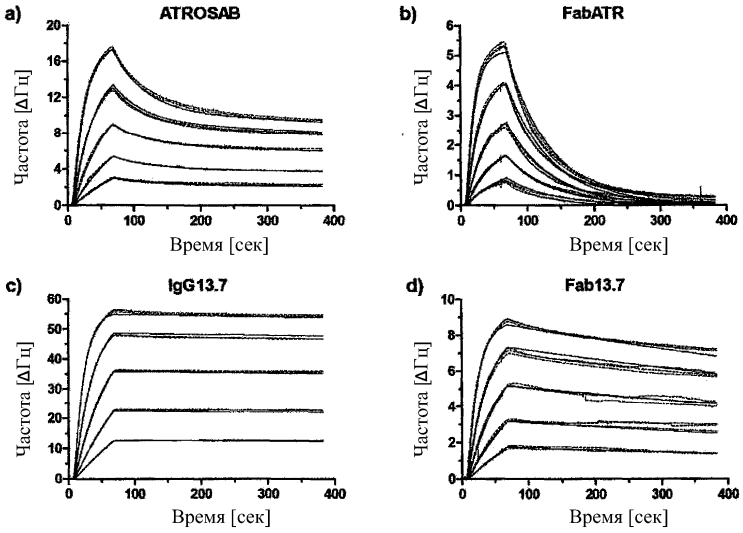
Фиг. 11



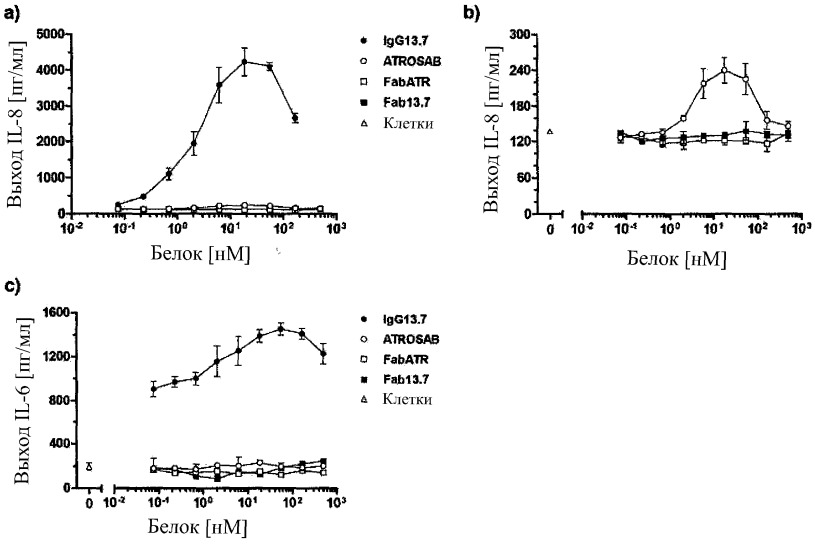
Фиг. 12



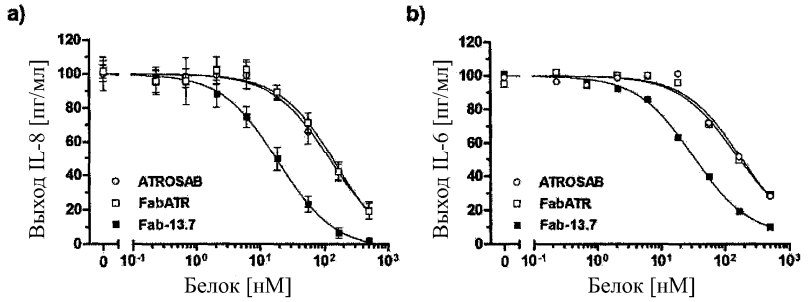
Фиг. 13



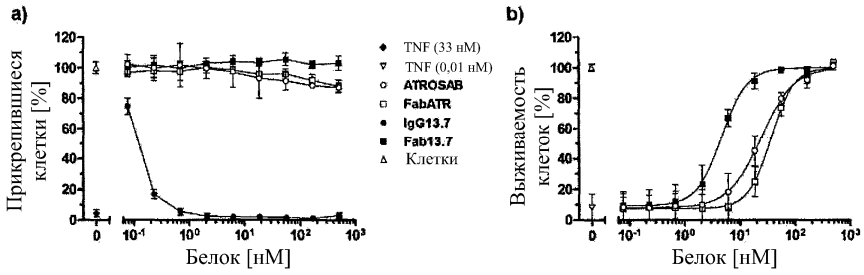
Фиг. 14



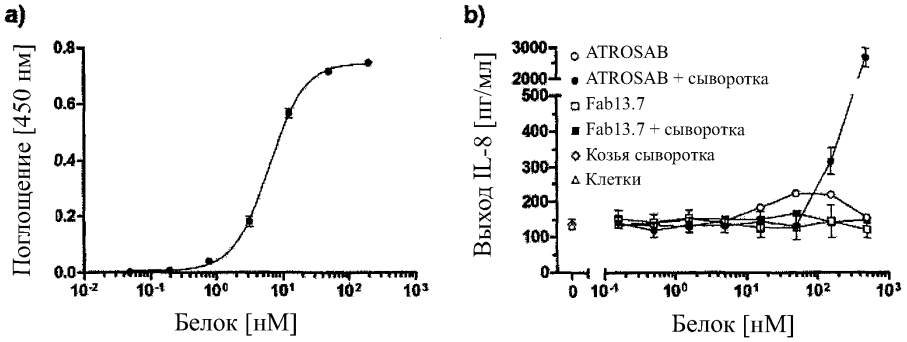
Фиг. 15



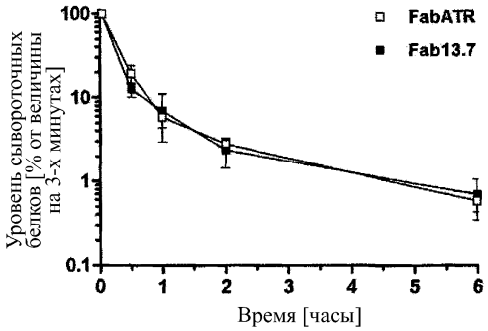
Фиг. 16



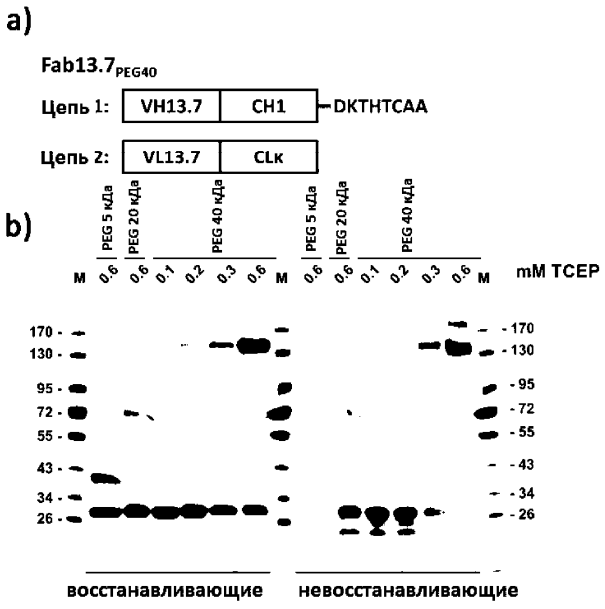
Фиг. 17



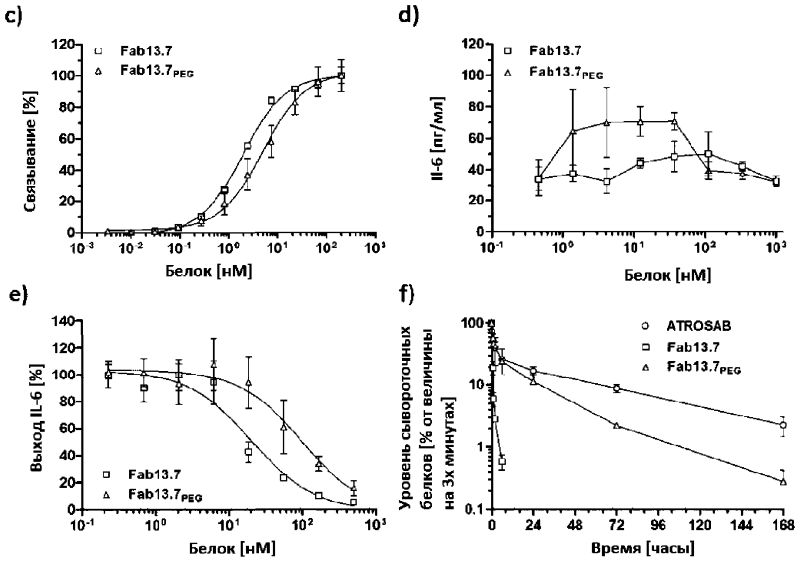
Фиг. 18



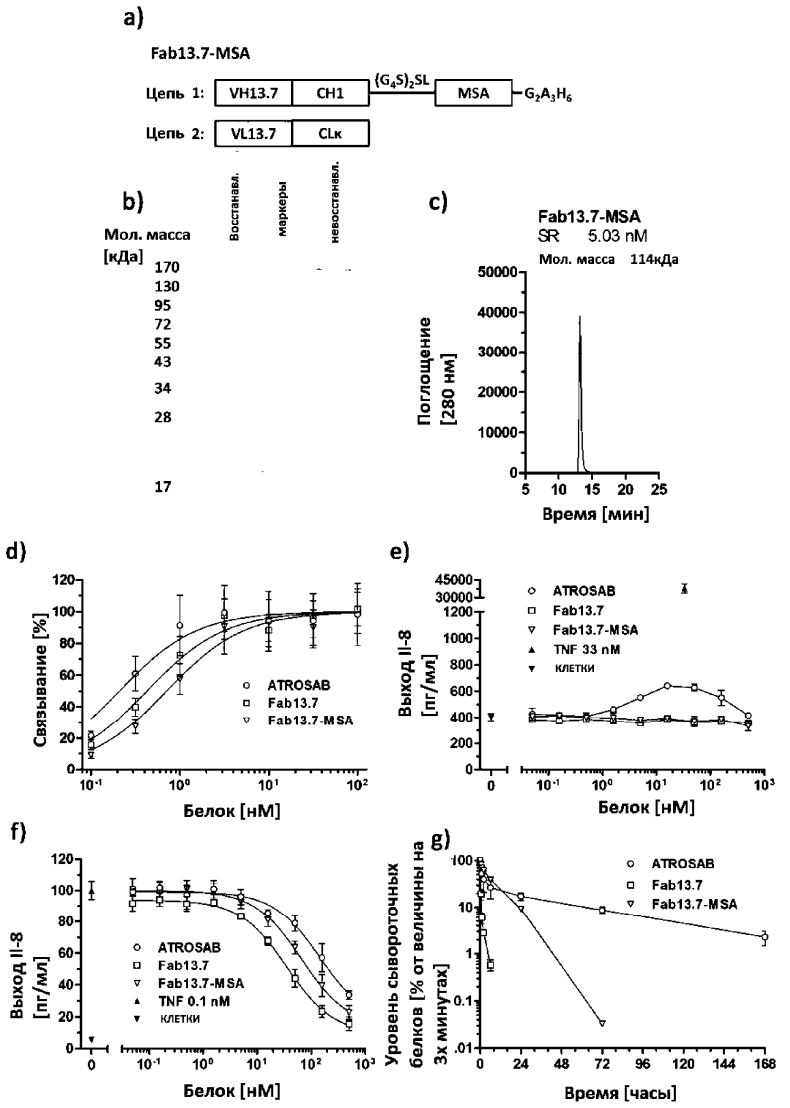
Фиг. 19



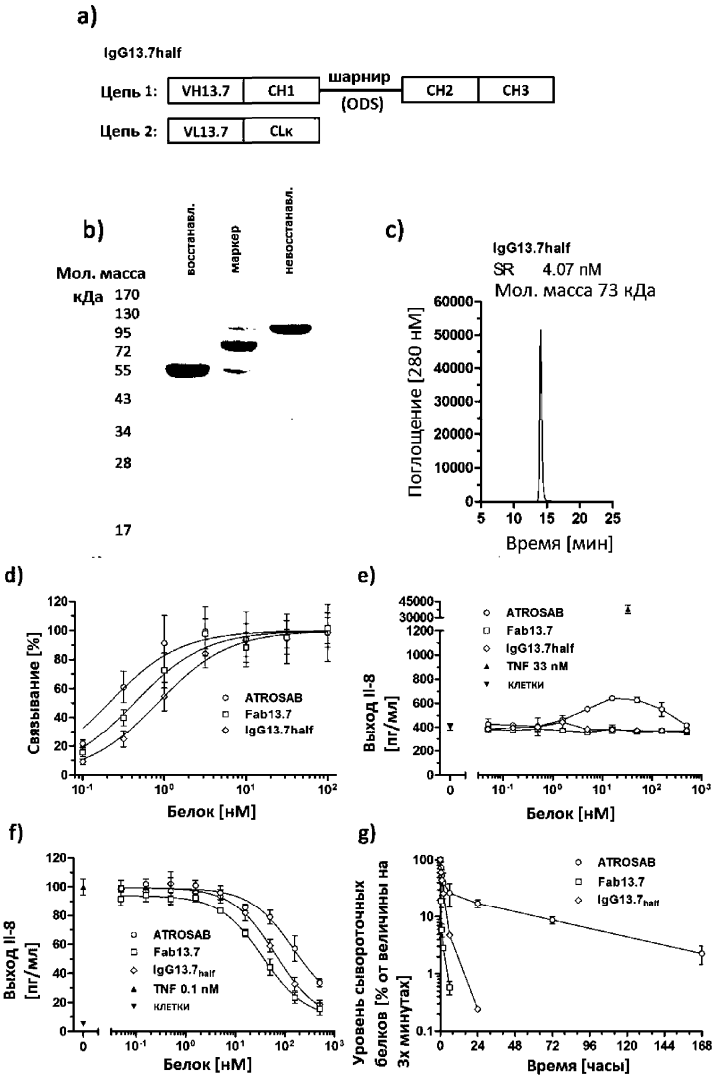
Фиг. 20



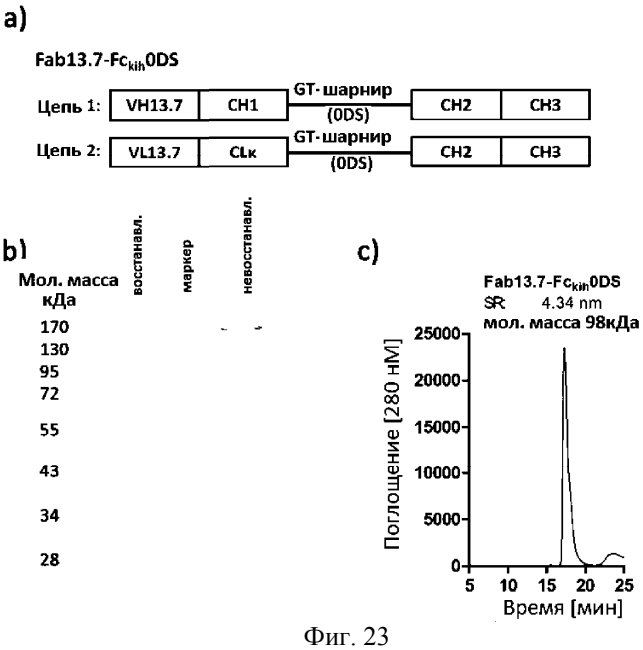
Фиг. 20 (продолжение)



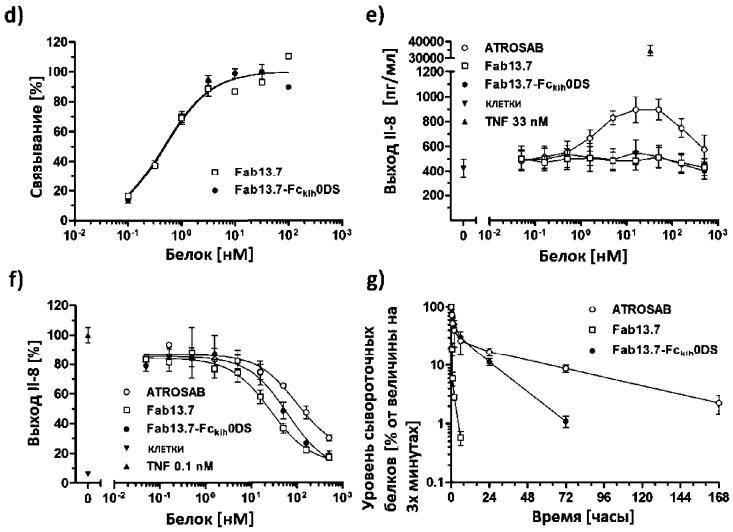
Фиг. 21


a)
IgG13.7half
Цепь 1:
VH13.7
CH1
шарнир
(ODS)
CH2
CH3
Цепь 2:
VL13.7
CLκ
b)
Мол. масса
кДа
170
130
95
72
55
43
34
28
17
восстанавл.
маркер
невосстанавл.
c)
IgG13.7half
SR 4.07 nM
Мол. масса 73 кДа
Поглощение [280 нМ]
Время [мин]
d)
Связывание [%]
ATROSAB
Fab13.7
IgG13.7half
Белок [нМ]
e)
Выход Il-8
[пг/мл]
ATROSAB
Fab13.7
IgG13.7half
TNF 33 nM
КЛЕТКИ
Белок [нМ]
f)
Выход Il-8
[пг/мл]
ATROSAB
Fab13.7
IgG13.7half
TNF 0.1 nM
КЛЕТКИ
Белок [нМ]
g)
Уровень сывороточных белков [% от величины на 3х минутах]
ATROSAB
Fab13.7
IgG13.7half
Время [часы]

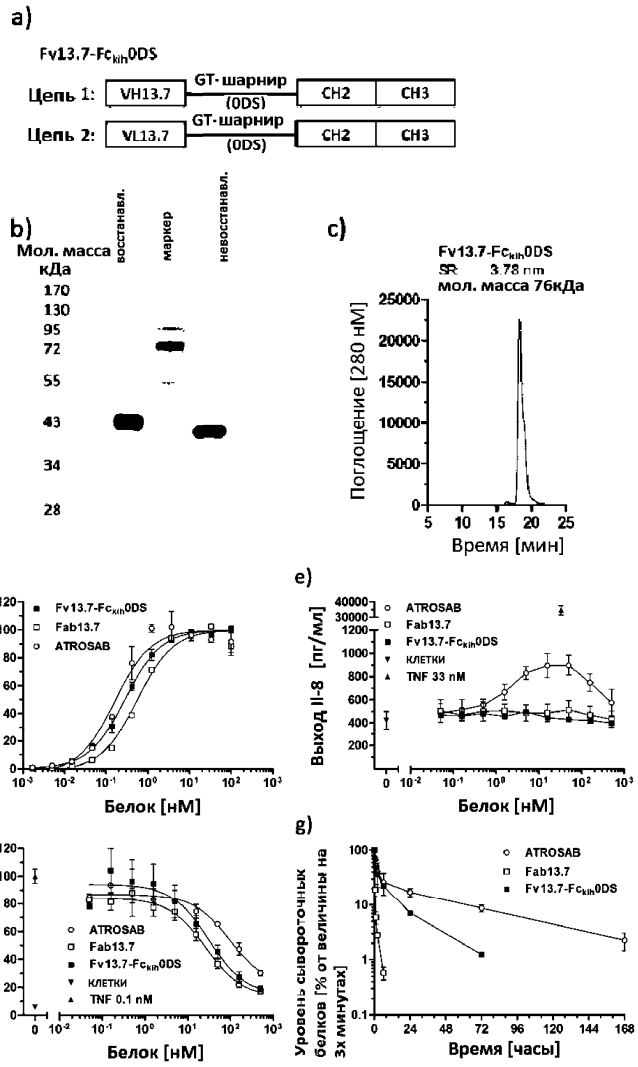
Фиг. 22


a)
Fab13.7-Fc$_{kih}$0DS
Цепь 1:
VH13.7
CH1
GT-шарнир
(0DS)
CH2
CH3
Цепь 2:
VL13.7
CLκ
GT-шарнир
(0DS)
CH2
CH3
b)
Мол. масса
кДа
170
130
95
72
55
43
34
28
восстанавл.
маркер
невосстанавл.
c)
Fab13.7-Fc$_{kih}$0DS
SR 4.34 nm
мол. масса 98кДа
Поглощение [280 нМ]
Время [мин]

Фиг. 23



Фиг. 23 (продолжение)



Фиг. 24

SEQ ID 1: DFYIN

SEQ ID 2: EIYPYSGHAYYNEKFKA

SEQ ID 3: WDFLDY

SEQ ID 4: RSSQSLLHSNGNTYLH

SEQ ID 5: TVSNRFS

SEQ ID 6: SQSTHVPYT

SEQ ID 7: EIXPXXGXAXYNXKFKA
В которой
X в положении 3 представляет собой любое из Y или V,
X в положении 5 представляет собой любое из Y или T или S,
X в положении 6 представляет собой любое из S или Q,
X в положении 8 представляет собой любое из H или E,
X в положении10 представляет собой любое из Y или K,
X в положении 13 представляет собой любое из E или D.

SEQ ID 8: SQXTHVPYT
В которой
X в положении 3 представляет собой любое из S или G.

SEQ ID 9: EIVPTQGEAKYNDKFKA

SEQ ID 10: EIVPXQGEAKYNDKFKA
В которой
X в положении 5 представляет собой любое из S или G.

SEQ ID 11: SQXTHVPYT
В которой
X в положении 3 представляет собой любое из G или S.

SEQ ID 12:
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPTQGE
AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
S

SEQ ID 13:
HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
S

SEQ ID 14:
QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDFYINWIRQAPGKGLEWVSEIYPYSGHA
YYNEKFKARFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID 15:
QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDFYINWIRQAPGKGLEWVSEIYPYSGHA
YYNEKFKARFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID 16:
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIKR

SEQ ID 17:
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQGTHVPYTFGGGTKVEIKR

SEQ ID 18:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLHSNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSN
RFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID 19:
DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLHSNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSN
RFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID 20:
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIYPYSGH
AYYNEKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID 21:
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIKR

SEQ ID 22:
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIYPYSGH
AYYNEKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID 23:
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIKR

SEQ ID 24:
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 25

SEQ ID 25:
HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

SEQ ID 26:
DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLHSNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSN
RFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID 27:
HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA

SEQ ID 28:
HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSS
LEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADES
AANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFE
RPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADK
ESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEI
TKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHC
LSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLL
RLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQN
AILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLH
EKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQI
KKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVGGAA
AHHHHHH

SEQ ID 29:
HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTAPVLDSDGSFRL
RSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID 30:
HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGTDKTHTSPPSP
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID 31:
DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLHSNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSN
RFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGTDKTHTSPPSP
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID 32:
HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
SGTDKTHTSPPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID 33:
DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLHSNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLI
YTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEI
KGTDKTHTSPPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID 34:
DKTHTCAA

SEQ ID 35:
DKTHTCPPCPAPELLGG

SEQ ID 36:
SASV

Фиг. 25 (продолжение)

SEQ ID 37:
DRVT

SEQ ID 38:
SLQP

SEQ ID 39
GGLV

SEQ ID 40
NAKNSL

SEQ ID 41
LQMN

SEQ ID 42
GTDKTHTSPPCPAPPVAG

SEQ ID 43
GTDKTHTCPPSPAPPVAG

SEQ ID 44
GTDKTHTSPPSPAPPVAG

Фиг. 25 (продолжение)