



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.24

(21) Номер заявки
202091182

(22) Дата подачи заявки
2018.11.27

(51) Int. Cl. **A61P 1/16** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АНТИ-huTNFR1 ТЕРАПИЯ НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА

(31) 17203853.1

(32) 2017.11.27

(33) EP

(43) 2020.07.29

(86) PCT/EP2018/082634

(87) WO 2019/102023 2019.05.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЛИОФАРМ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Бантель Хайке, Пфиценмайер Клаус
(DE), Херрманн Андреас (CH)**

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

(56) Yaron Ilan: "ABSTRACT FINAL ID: 663: A novel method for anti-TNF based-oral immunotherapy : Oral administration of a plant cell-expressed recombinant anti-TNF fusion protein for treating of fatty liver disease", 8 November 2014, (2014-11-08), XP055459107, Retrieved from the Internet: URL:https://liverlearning.aasld.org/aasld/2014/theli-vermeeting/60709/yaron.ilan.a.novel.method.for.anti-tnf.based-oral.immunotherapy.oral.html?f=m211172, [retrieved on 2018-03-14], cited in the application, the whole document

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, cited in the application, the whole document

ZETTLITZ KIRSTIN A. ET AL. "ATROSAB, a humanized antagonistic anti-tumor necrosis factor receptor

one-specific antibody", 20101130, vol. 2, no. 6 30 November 2010, (2010-11-30), pages 639-647, XP008131512, ISSN: 1942-0870, DOI: 10.4161/MABS.2.6.13583, Retrieved from the Internet: URL:https://www.landesbioscience.com/my_pdfs/cited in the application, the whole document

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, cited in the application, the whole document

MARCELA APARICIO-VERGARA ET AL. "Tumor necrosis factor receptor 1 gain-of-function mutation aggravates nonalcoholic fatty liver disease but does not cause insulin resistance in a murine model", HEPATOLOGY, vol. 57, no. 2, 10 January 2013, (2013-01-10), pages 566-576, XP055457426, US ISSN: 0270-9139, DOI: 10.1002/hep.26046, cited in the application, the whole document see in particular abstract; pages 573-575; Fig. 4

K. TOMITA. "Tumour necrosis factor signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice", GUT, vol. 55, no. 3, 1 March 2006, (2006-03-01), pages 415-424, XP055457615, UK ISSN: 0017-5749, DOI: 10.1136/gut.2005.071118, cited in the application, the whole document see in particular abstract; page 423, last paragraph

WO-A1-2012035141

WO-A1-2017174586

WO-A2-2007058894

LINDA A. FEAGINS ET AL. "Nonalcoholic fatty liver disease : a potential consequence of tumor necrosis factor-inhibitor therapy", EUROPEAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY, vol. 27, no. 10, 1 October 2015, (2015-10-01), pages 1154-1160, XP055548002, UK ISSN: 0954-691X, DOI: 10.1097/MEG.0000000000000421, cited in the application, the whole document

(57) Изобретение относится к лечению неалкогольного стеатогепатита (NASH) и связанных с ним состояний и предлагает лечение указанных заболеваний и состояний путем применения антитела, специфически распознающего человеческий рецептор-1 фактора некроза опухолей (huTNFR1) для применения при лечении неалкогольного стеатогепатита (NASH) и связанных с ним заболеваний. Изобретение удовлетворяет потребность в эффективном лечении NASH и связанных с ним состояний.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к новому лечению неалкогольного стеатогепатита (NASH) и связанных с ним заболеваний.

Предшествующий уровень техники

Неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) представляет собой спектр заболеваний, возникающих при отсутствии злоупотребления алкоголем, и включает неалкогольный стеатогепатит (NASH). NAFLD показывает рост заболеваемости в западных странах и вносит критический вклад в развитие гепатоцеллюлярной карциномы.

Одним из фундаментальных шагов на пути от доброкачественного стеатоза печени к прогрессирующему стеатогепатиту является появление гибели клеток гепатоцитов, классифицируемой как апоптоз. Некроптоз появился в качестве альтернативного запрограммированного пути гибели клеток, и было обнаружено, что он активируется в печени пациентов с NASH (Gautheron et al. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 2015, 1:264-266).

Aparicio-Vergara et al. (*Hepatology* 2013, 57 (2): 566-576) описывают роль слияния эктодомена TNFR1 в предотвращении развития стеатоза печени или инсулинорезистентности. Невозможность слияния TNFR1 не приводила к ожирению, инсулинорезистентности или стеатозу печени у мышей. Однако мыши, содержащие мутацию без слияния, показали быстрое прогрессирование в направлении NASH. Было обнаружено, что активация выделения эктодомена TNFR1 играет ключевую роль в ослаблении прогрессии в направлении NASH.

Cubero et al. (*Cell Death and Differentiation* 2013, 20:1580-1592) описывают, что TNFR1 в гепатоцитах и иммунных клетках играют разные роли в способе действия при хроническом заболевании печени.

Tomita et al. (*Gut* 2006, 55: 415-424) описывают, что усиление опосредуемого TNF α /TNFR сигнального пути может быть критически вовлечено в патогенез фиброза печени на модели животных NASH.

Yaron Ilan (AASLD Liver Learning. Ilan Y. Nov 8 2014; 60709) раскрывает пероральную иммунотерапию на основе анти-TNF для лечения жировой болезни печени. Анти-TNF гибридный белок (PRX-106), который связывает TNF α , использовали на мышинной модели с высоким содержанием жира в диете.

Было обнаружено, что антитела к TNFR1 обладают агонистическим потенциалом, вызывая ответ, имитирующий лиганд. Этот ответ предполагает, что сигнальная трансдукция инициируется агрегацией рецепторов путем связывания поливалентных тримеров TNF.

Тем не менее, TNFR1-селективное ингибирование может быть достигнуто с помощью TNFR1-специфических антител. Например, моноклональное мышинное антитело, H398 и антитело, описанное в US 5736138, с селективностью в отношении человеческого TNFR1, продемонстрировало сильное ингибирование опосредованной TNF трансдукции сигнала и цитотоксичности (Moosmayer et al. 1995, *Ther. Immunol.* 2:31-40).

Гуманизированная версия H398 описана в WO2008/113515A2.

В WO2012035141 раскрыто антитело против huTNFR1, которое дефицитно по опосредованию эффекторной функции.

Моновалентные антитела против huTNFR1 описаны в WO2017174586 A1.

Zettlitz et al. (*LandesBioscience* 2010, November/Dezember: 639-647) описывают получение гуманизированного TNFR1-специфического антагонистического моноклонального антитела.

Richter et al. (*PLOS One* 2013, 8 (8): 1-13) описывают применение гуманизированного антагонистического анти-TNFR1 антитела для селективного ингибирования сигнального пути TNFR1 при снижении провоспалительной активности TNF, оставляя при этом нетронутым TNFR2.

Berger et al. (*Protein Engineering, Design & Selection* 2013, 26(10):581-587) описывают гибридный белок анти-TNFR1 scFv-HAS как селективный антагонист действия TNF. Feagins et al. (*Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2015, 27 (10): 1154-1160) описывают, что у пациентов, получавших ингибиторы фактора некроза опухоли (TNFi), развивается неалкогольная жировая болезнь печени (NASH или стеатоз).

Терапевтические возможности лечения NASH лимитированы и ограничены модификациями образа жизни, так как конкретные лекарства пока недоступны. Таким образом, существует потребность в обеспечении эффективного лечения NASH и связанных с ним заболеваний.

Сущность изобретения

Задачей изобретения является обеспечение улучшенного лечения NASH и соответствующих болезненных состояний.

Задача решается объектом изобретения.

Изобретение предусматривает новое медицинское применение антител, которые специфически распознают человеческий рецептор-1 фактора некроза опухоли (huTNFR1), для лечения пациентов, страдающих NASH и/или, в частности, любым заболеванием, связанным с NASH, среди которых стеатоз печени, активность заболевания NAFLD (NAS), апоптоз, фиброз и высокие уровни аланинтрансаминазы (ALT) и инсулина. Следовательно, изобретение обеспечивает новый способ лечения пациентов, страдающих от NASH и связанных с ним заболеваний.

В частности, изобретение относится к антителу, специфически распознающему huTNFR1, для применения при лечении неалкогольного стеатогепатита (NASH) и связанных с ним заболеваний.

Согласно конкретному аспекту, антитело представляет собой выделенное антитело.

Согласно конкретному аспекту, антитело представляет собой моноклональное и/или рекомбинантное антитело.

В соответствии с конкретным аспектом, антитело специфически распознает эпитоп в мембранно-дистальном CRD1 и/или субдомене A1 CRD2 из huTNFR1, предпочтительно специфически распознает эпитоп, представленный аминокислотами с 1 по 115 или с 1 по 70 в N-концевой области huTNFR1. В частности, последовательность huTNFR1 идентифицируется как SEQ ID NO: 32.

Согласно конкретному воплощению, антитело представляет собой моносpezifическое, двухвалентное полноразмерное антитело или фрагмент антигенсвязывающего антитела.

В соответствии с другим конкретным воплощением антитело представляет собой одновалентное связывающее huTNFR1, содержащее только один антигенсвязывающий сайт, который обладает специфичностью связывать huTNFR1. В частности, антитело моновалентно распознает huTNFR1.

Согласно конкретному воплощению антитело выбрано из группы "одновалентных антител", состоящей из молекул Fab, молекул scFv, единичных переменных доменов, дисульфид-стабилизированных Fv (dsFv), антител полу-IgG1 и Fv-доменов или функционально активных производных любого из вышеупомянутых, предпочтительно, где конструкция антитела связана с гидрофильным полимером, таким как ПЭГ, и/или слита с полипептидом, таким как человеческий (или мышинный) сывороточный альбумин, трансферрин, альбумин-связывающие домены или пептиды, Ig-связывающие домены или пептиды, удлинения ПЭГ-миметического полипептида, Fc-фрагмент антитела, Fc-фрагмент антитела, несущий мутации для обеспечения предпочтительной гетеродимеризации (по сравнению с гомодимеризацией), или функциональный вариант любого из вышеуказанных полипептидов.

В частности, антитело представляет собой любой домен Fab, scFv, dsFv или Fv, который слит с фрагментом Fc антитела, где Fc состоит из гетеродимера доменов CH2 и CH3, где домены CH2 и/или CH3 несут одну или несколько точечных мутаций, которые допускают преимущественную гетеродимеризацию по сравнению с гомодимеризацией. В частности, один или оба домена CH3 в Fc модифицированы для изменения аминокислотной структуры, например, для получения Fc, содержащего гетеродимер доменов CH3/CH3.

В частности, конструкция антитела включает Fv-домены, слитые с Fc-областью или фрагментом антитела, с дополнительными доменами антитела или без них, при этом сохраняя моновалентную связывающую структуру антитела. Конкретный пример относится к фрагменту Fab или фрагменту Fv, слитому с Fc или модифицированным Fc.

Предпочтительное антитело включает тяжелую и легкую цепи, где тяжелая цепь состоит из домена VH, домена CH2 и CH3, необязательно дополнительно включает один или несколько линкеров, а легкая цепь состоит из домена VL, домена CH2 и CH3, необязательно дополнительно включает один или несколько линкеров.

Конкретные воплощения включают Fc из IgG1 человека, в котором домены CH2-CH3 образуют гетеродимер в результате одной или нескольких мутаций "выступы-в-углубления", например, мутаций "выступов", модифицирующих поверхность бета-листов CH3, присутствующих на одном мономере домена CH3, которые представляют собой T366W; и мутаций "углублений", модифицирующих поверхность бета-листов CH3, присутствующих на другом мономере домена CH3, которые выбраны из группы, состоящей из T366S, L368A, Y407V.

В частности, антитело включает Fc-область, которая включает одну или несколько мутаций для снижения эффективности эффекторной функции. В соответствии с конкретным аспектом, Fc-область получена с помощью гликоинженерии так, чтобы понижать модуляцию эффекторной функции.

В соответствии с конкретным воплощением конструкция антитела включает Fc-область человеческого или искусственного IgG1, которая представляет собой функциональный вариант Fc из IgG1 человека с идентичностью последовательностей, по меньшей мере, любой из 60%, 70%, 80%, 85% или 90%, которая подвергнута мутации для понижения эффекторной функции. Предпочтительно Fc-область включает тяжелую цепь, по меньшей мере, с одной мутацией, выбранной из группы, состоящей из E233P, L234V, L235A, 2G236, A327G, A330S и P331S, предпочтительно, включающей A327G/A330S/P331S (нумерация индекса EU по Kabat). Предпочтительно, по меньшей мере, две из указанных мутаций, более предпочтительно, по меньшей мере, три, четыре, пять или все шесть мутаций встроены в последовательность Fc. SEQ ID NO: 31 идентифицирует последовательность Fc из IgG1 человека.

В частности, антитело является ПЭГ-илированным, ГЭК-илированным или ПСА-илированным.

В частности, антитело ПЭГ-илируется с помощью ПЭГ с молекулярной массой в диапазоне от 5000 до 150000 г/моль. Типичные конструкции антител, такие как Fab, ПЭГ-илированы с помощью ПЭГ 40000.

В частности, антитело представляет собой половинное антитело IgG1, характеризующееся только одной Fab-частью, шарнирной областью и одной Fc-частью, где шарнирная область и/или Fc-часть (в частности, Fc из IgG1 человека) включает одну или несколько мутаций для того, 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: 33): C226S, C229S (нумерация EU) и мутации в

части Fc: P395A, F405R, Y407R, K409D (нумерация EU).

В частности, антитело представляет собой гибридный белок Fv-Fc, где Fv состоит из пары доменов VH/VL, и где VH слит с первой цепью домена CH2-CH3 через первую область шарнира/линкера, а VL слит со второй цепью домена CH2-CH3 через вторую область шарнира/линкера. Предпочтительно первая и вторая доменные цепи CH2-CH3 отличаются друг от друга одной или несколькими точечными мутациями, например, для обеспечения преимущественной гетеродимеризации между первой и второй цепями домена CH2-CH3, в результате чего получают препарат Fv-Fc, который характеризуется Fc-гетеродимером, например, через мутации "выступы-в-углубления", как указано выше.

Конкретно, антитело включает стабилизированный дисульфидом Fv (dsFv), который характеризуется одной или несколькими дополнительными (искусственными) междоменными дисульфидными связями. Такие дисульфидные связи получают путем введения одного или нескольких дополнительных остатков цистеина в любом из доменов VH и VL в подходящих положениях, которые можно использовать в качестве мостика из дисульфидных связей, соединяющих домены VH и VL, где дисульфидные связи получают после восстановления цистеинов. Согласно конкретным примерам, дисульфидная связь может быть введена в Fv в любом из следующих положений в VH и соответствующих положениях 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 частности, антитело включает

а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), включающий определяющие комплементарность области (CDR): VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3; и

б) вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий CDR: VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3,

где

i)

VH-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 1;

VH-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 2;

VH-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 3;

VL-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 4;

VL-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 5;

VL-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 6; или

ii)

VH-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 23;

VH-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 24;

VH-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 25;

VL-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 26;

VL-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 27;

VL-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 28;

где нумерация соответствует индексу EU по Kabat;

или функционально активный вариант любого из i) или ii) выше, который включает 0, 1 или 2 (или до 1, то есть 0 или 1) точечные мутации в каждой из последовательностей CDR и который специфически распознает huTNFR1.

В частности, антитело включает VH и VL,

где VH-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 1;

VH-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 2;

VH-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 3;

VL-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 4;

VL-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 5; и

VL-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 6;

где нумерация соответствует индексу EU по Kabat;

или его функционально активный вариант, включающий до 1 (то есть, 0 или 1) точечной мутации в любой одной или нескольких или в каждой из последовательностей CDR, и который специфически распознает huTNFR1.

В частности, последовательности VH и VL характеризуются последовательностями VH- и VL-CDR, где

i)

VH-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 1;

VH-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 10, где X в положении 5 представляет собой S;

VH-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 3;

VL-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 4;

VL-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 5; и

VL-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 11, где X в положении 3 представляет собой G;

или ii)

VH-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 1;

VH-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 10, где X в положении 5 представляет собой S;

VH-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 3;

VL-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 4;

VL-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 5; и

VL-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 11, где X в положении 3 представляет собой S.

В частности, антитело включает последовательность VH, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 7 или 9; и последовательность VL, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 8 или 10, или их функционально активный вариант, включающий до 1 точечной мутации в любой одной или нескольких или в каждой из последовательностей CDR и по меньшей мере 60% идентичности последовательностей в любой одной или нескольких, или в каждой из каркасных (FR) последовательностей FR1-4 из VH и VL.

Конкретные комбинации VH/VL, включающие антигенсвязывающий сайт, способный специфически узнавать и связываться с huTNFR1, представляют собой любое из:

а) последовательность VH, включающая или состоящая из SEQ ID NO: 7; и последовательность VL, включающая или состоящая из SEQ ID NO: 8; или

б) последовательность VL, включающая или состоящая из SEQ ID NO: 9; и последовательность VL, включающая или состоящая из SEQ ID NO: 10.

В частности, антитело представляет собой полноразмерный или антигенсвязывающий фрагмент антитела, включающий или состоящий из Fab, который включает:

а) последовательность тяжелой цепи (HC), включающую или состоящую из SEQ ID NO: 11; и

б) последовательность легкой цепи (LC), включающую или состоящую из SEQ ID NO: 12;

или его функционально активный вариант, включающий до 1 точечной мутации в любой одной или нескольких или в каждой из последовательностей CDR доменов VH и VL, содержащихся в HC и LC, соответственно, и по меньшей мере 60% идентичности последовательностей в любой одной или нескольких, или в каждой из FR-последовательностей FR1-4 доменов VH и VL.

В частности, антитело включает:

а) последовательность HC, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 18; и

б) последовательность LC, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 13;

или его функционально активный вариант, включающий до 1 точечной мутации в любой одной или нескольких или в каждой из последовательностей CDR доменов VH и VL, содержащихся в HC и LC, соответственно, и по меньшей мере 60% идентичности последовательностей в любой одной или нескольких, или в каждой из FR-последовательностей FR1-4 доменов VH и VL.

Конкретные функционально активные варианты антитела, включающего HC, идентифицированной в SEQ ID NO: 18, и LC, идентифицированной в SEQ ID NO: 13, включают

HC, состоящую из:

а) VH, включающей или состоящей из SEQ ID NO: 19 или, по меньшей мере, последовательностей CDR, содержащихся в указанной последовательности VH;

б) линкерной последовательности, состоящей из 4-10 аминокислот, например, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, предпочтительно состоящей из ряда глицинов, серинов или треонинов, в любой комбинации, такой как, например, линкер, состоящий из SEQ ID NO: 15;

с) домена CH2, включающего или состоящего из SEQ ID NO: 16; и

д) домена CH3, включающего или состоящего из SEQ ID NO: 20; и

LC, состоящую из:

а) VL, включающей или состоящей из SEQ ID NO: 14 или, по меньшей мере, последовательностей CDR, содержащихся в указанной последовательности VH;

б) линкерной последовательности, состоящей из 4-10 аминокислот, например, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, предпочтительно состоящей из ряда глицинов, серинов или треонинов, в любой комбинации, такой как, например, линкер, состоящий из SEQ ID NO: 15;

с) домена CH2, включающего или состоящего из SEQ ID NO: 16; и

д) домена CH3, включающего или состоящего из SEQ ID NO: 17.

В частности, такое антигенсвязывающее антитело кодируется одной или несколькими молекулами нуклеиновой кислоты, включающими

а) HC, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 22; и

б) LC, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 21;

или его функционально активный вариант, включающий до 1 точечной мутации в любом одном или нескольких или в каждой из последовательностей CDR доменов VH и VL, содержащихся в HC и LC, соответственно, и по меньшей мере 60% идентичности последовательностей в любой одной или нескольких, или в каждой из FR-последовательностей FR1-4 доменов VH и VL.

Согласно конкретному воплощению антитело включает антигенсвязывающий сайт, характеризующийся следующей комбинацией шести последовательностей CDR, которые включают или состоят из:

SEQ ID NO: 23: VH-CDR1;

SEQ ID NO: 24: VH-CDR2;

SEQ ID NO: 25: VH-CDR3;

SEQ ID NO: 26: VL-CDR1;

SEQ ID NO: 27: VL-CDR2; и

SEQ ID NO: 28: VL-CDR3;

или его функционально активный вариант, включающий до 1 точечной мутации в любой одной или нескольких или в каждой из последовательностей CDR, и специфически распознающий huTNFR1.

В частности, антитело включает антигенсвязывающий сайт, включенный в домены VH и VL, где

a) VH включает или состоит из SEQ ID NO: 29; и

b) VL включает или состоит из SEQ ID NO: 30;

или его функционально активный вариант, включающий 0, 1 или 2 (или до 1) точечных мутаций в любой одной или нескольких или в каждой из последовательностей CDR доменов VH и VL и, по меньшей мере, 60% идентичности последовательностей в любой одной или нескольких или в каждой из FR-последовательностей FR1-4 доменов VH и VL.

В частности, антитело включает домен VH и VL, где по меньшей мере один из доменов VH и VL представляет собой функциональный вариант родительского домена, подвергнутого созреванию аффинности, включающий по меньшей мере одну точечную мутацию в любой из последовательностей области, определяющей комплементарность (CDR), где

a) родительский домен VH характеризуется последовательностями CDR: SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25; и

b) родительский домен VL характеризуется последовательностями CDR: SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28.

В частности, указанная по меньшей мере одна точечная мутация присутствует в любой из SEQ ID NO: 24 и/или SEQ ID NO: 28.

В частности, любое из типичных антител (которые представляют собой антитела, характеризующиеся последовательностями, представленными в настоящем документе), может быть использовано согласно изобретению. Аналогичным образом могут быть использованы любые альтернативные антитела, которые включают тот же антигенсвязывающий сайт и/или имеют одинаковую специфичность связывания с мишенью. Конкретными альтернативными антителами являются те, которые являются функциональными вариантами типичных антител, где любое из типичных антител можно использовать в качестве "родительского" для получения варианта, который обладает функцией специфического распознавания мишени huTNFR1.

В частности, антитело представляет собой антитело, полученное путем созревания аффинности у родительского антитела, которое характеризуется последовательностями, представленными в настоящем документе, в частности, где 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей CDR являются функционально активными вариантами CDR, включающими до 1 точечной мутации по сравнению с соответствующей CDR в родительском антителе.

В конкретных воплощениях функционально активное вариантное антитело включает только 0, 1, 2 или 3 точечных мутации в каждой из последовательностей CDR, предпочтительно только 0, 1 или 2 точечных мутации в каждой из последовательностей CDR, где точечная мутация представляет собой любое из числа замены, вставки или делеции одной аминокислоты.

Любой из функционально активных вариантов антитела (родительского антитела), описанных в данном документе, конкретно характеризуется специфичностью связывания huTNFR1. Функционально активный вариант может включать одну или несколько мутантных последовательностей FR, которые включают одну или несколько, например, несколько точечных мутаций, например до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 точечных мутаций для получения вариантной последовательности, по меньшей мере, с 60% идентичности последовательностей или, по меньшей мере, 70% идентичности последовательностей, или, по меньшей мере, 80% идентичности последовательностей, или, по меньшей мере, 90% идентичности последовательностей по сравнению с соответствующей последовательностью FR в родительском антителе.

В частности, антитело включает антигенсвязывающий фрагмент, который связывает huTNFR1 с KD менее 10^{-8} М или 5×10^{-9} М и k_{off} менее 10^{-3} с⁻¹. Аффинность связывания и характеристики связывания (ассоциация и диссоциация) конкретно определяются в стандартном тесте для определения моновалентного связывания, по существу исключая эффекты avidности двухвалентного связывания. Стандартный тест основан на измерении пьезоэлектрического микровзвешивания (QCM) при физиологической температуре (около 37°C или при 37°C +/- 1°C). Такое измерение аффинности, в частности, выполняется в формате Fab. Таким образом, если антитело представляет собой любое другое, отличное от Fab, антигенсвязывающий сайт, в частности, вводится в соответствующую молекулу Fab для измерения аффинности с помощью QCM при 37°C. Это обеспечивает сопоставимость результатов измерения аффинности одновалентных связывающих независимо от эффектов avidности, которые могут помешать измерению аффинности. Особенно предпочтительный QCM выполняется при умеренной плотности рецепторов. В частности, аффинность связывания конструкции антитела с huTNFR1 определяют для формата Fab с помощью QCM при 37°C и умеренной плотности рецепторов в диапазоне 50-100 Гц, например, приблизительно при 50 Гц или при 50 Гц +/- 10 Гц или при 50 Гц +/- 5 Гц.

В частности, KD составляет менее 4×10^{-9} М или менее 3×10^{-9} М или менее 2×10^{-9} М или менее 10^{-9} М или даже менее 10^{-10} М.

В частности, koff составляет менее 10^{-3} , или менее $5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, или менее 10^{-4} с^{-1} , или менее 10^{-5} с^{-1} .

В частности, антигенсвязывающий фрагмент распознает huTNFR1 с кон по меньшей мере $10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$.

В соответствии с конкретным аспектом болезненные состояния представляют собой любое из числа стеатоза печени, воспаленной печени, фиброза печени (или апоптоза) и гепатоцеллюлярной карциномы. В частности, подвергают лечению пациента с NASH, который подвержен риску развития или уже страдает от какого-либо заболевания. Несколько показателей NASH или связанных с ними заболеваний включают активность болезни NAFLD (NAS) и высокие уровни ALT и инсулина в сыворотке, которые могут быть эффективно снижены при лечении, описанном в настоящем документе.

В частности, пациент также страдает от сахарного диабета II типа, сахарного диабета I типа, пре-диабет, инсулинорезистентности или ожирения, при этом под ожирением понимают пациента с индексом массы тела

$$\geq 30$$

В частности, антитело вводят пациенту в эффективном количестве. В частности, это количество эффективно для противодействия передаче сигналов TNFa/huTNFR1. Особенно предпочтительно, чтобы антитело представляло собой антагонистическое антитело, что таким образом позволяет избежать существенной передачи сигналов и трансдукции, опосредованной TNFa/TNFR, измеренной в анализе на основе клеток. Любое из антител, описанных в настоящем документе и характеризующихся последовательностями антител, приведенными в данном документе, в частности, понимается как антагонистические антитела.

Согласно конкретному аспекту, антитело непосредственно ингибирует взаимодействие рецептора TNF-huTNFR1, что определяется в анализе на основе клеток, предпочтительно посредством анализа для ингибирования опосредованной TNFR1 клеточной гибели у клеток Кум-1 или путем анализа ингибирования высвобождения IL-6 или IL-8 из клеток HeLa или клеток HT1080, соответственно. В частности, в анализе ингибирования TNFR1-опосредованной гибели клеток в клетках Кум-1 значение IC_{50} составляет менее $5,0 \times 10^{-9}$ М. В частности, в анализе ингибирования высвобождения IL-6 из клеток HeLa значение IC_{50} составляет менее $4,0 \times 10^{-8}$ М или в анализе на ингибирование высвобождения IL-8 из клеток HT1080 значение IC_{50} составляет менее $2,0 \times 10^{-8}$ М.

В соответствии с конкретным воплощением используют антитело, которое связывается с huTNFR1 моновалентным взаимодействием и снижает риск проявления агонистической активности TNF-миметика. Особенно предпочтительными являются антитела с высокой аффинностью связывания с TNFR1 и низкой скоростью диссоциации, что обеспечивает превосходное ингибирование TNFR1-зависимых ответов TNF.

В частности, антитело, описанное в настоящем документе, предоставляется в фармацевтическом составе, содержащем антитело и фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель. Из-за антагонистических свойств антитела фармацевтический состав может содержать высокие концентрации антител, позволяя избежать при этом побочных эффектов, возникающих в результате агонистической активности.

В частности, фармацевтический состав составлен для парентерального применения, предпочтительно путем внутривенного или подкожного введения.

В частности, антитело, описанное в настоящем документе, обладает низкой иммуногенностью и может многократно использоваться без образования ингибиторов, таких как антитела к лекарственному средству (ADA).

Неожиданно оказалось, что описанные в данном документе антитела, в частности моновалентные антитела, можно использовать для лечения пациентов, у которых развивается ADA, например, которые выработали антитела против иммуноглобулина или иммунотерапевтических антител. В предшествующем уровне техники наличие таких ADA, в частности, исключало бы дальнейшую иммунотерапию антителами, направленными против TNFR1, поскольку ADA обладает способностью перекрестно связывать антитела при связывании TNFR1 на клеточной поверхности, тем самым потенциально агонистически действуя на передачу сигналов TNFR1. Однако антитела, описанные в данном документе, не действуют агонистически (или по существу не действуют агонистически) на передачу сигналов TNFR1 даже в присутствии ADA.

В частности, фармацевтический состав, описанный в данном документе, может быть введен пациентам, у которых развились ADA, например ADA против анти-huTNFR1 антител или любых структур IgG.

В частности, эффективное количество антитела вводят пациенту, страдающему NASH, для уменьшения любого одного или нескольких из числа

- стеатоза, содержания триглицеридов, воспаления и/или апоптоза в ткани печени;
- уровня аминотрансферазы в сыворотке;
- инсулинорезистентности и, возможно, положительной динамики толерантности к глюкозе; и/или

d) балла активности NAFLD.

В частности, антитело вводят пациенту, страдающему NASH, в дозе от 0,05 до 20 мг/кг, предпочтительно от 0,2 до 6 мг/кг. Количество, эффективное для человека, может быть выведено из терапевтически эффективной дозы, описанной в мышинной модели (20 мг/кг). HED (эквивалентная доза для человека) составляет ~ 1-2 мг/кг.

Предпочтительные дозы антител составляют, например, от 0,5 до 1000 мг, предпочтительно 1-400 мг. При введении подкожно предпочтительная доза составляет от 0,5 до 400 мг.

Согласно конкретному аспекту антитело вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве путем системного введения, предпочтительно путем внутривенной инфузии или болюсной инъекции.

В соответствии с конкретным воплощением антитело вводят пациенту многократно, например, еженедельно, в.в. или п.к. инъекциями в дозе, например, 0,5-5 мг/кг, в частности, около 2 мг/кг. Частоту и дозу вводимого лекарственного средства можно адаптировать к состоянию болезни и реакции на терапию.

В частности, антитело вводят пациенту, страдающему NASH, в сочетании с диетической обработкой. Лечение антителами может, в частности, сочетаться с противовоспалительными лекарственными средствами, такими как NSAP/NSAID, или с терапией с применением агониста фарнезоидного X-рецептора (FXR), агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP1R) или агониста рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR).

Если не указано иное, положения в данном документе нумеруются в соответствии с индексом EU по Kabat. Объяснение схемы нумерации Kabat можно найти в Kabat, EA, et al, Sequences of proteins of immunological interest (NIH publication no. 91-3242, 5th edition (1991)).

Чертежи

Фиг. 1: B6-huTNFR1-k/i-мыши получали диету с высоким содержанием жира (HFD) в течение 32 недель, включая лечение анти-TNFR1 или контрольным антителом (Ab) в течение последних 8 недель. Ткани печени мышей HFD, получавших анти-TNFR1-Ab, показали значительное снижение стеатоза (A), содержания триглицеридов (B) и показателя активности NAFLD (C) в тканях печени по сравнению с тканями печени от мышей, обработанных контрольным антителом. * P <0,05; ** p <0,01.

Фиг. 2: B6-huTNFR1-k/i-мыши получали диету с высоким содержанием жира (HFD) в течение 32 недель, включая обработку анти-TNFR1 или контрольным антителом (Ab) в течение последних 8 недель. Ткани печени мышей HFD, обработанных анти-TNFR1-Ab, показали улучшение фиброза печени, оцененное окрашиванием Сириусом красным (A), которое было значительным по сравнению с тканями печени от мышей, обработанных контрольным антителом (B). *p<0,05.

Фиг. 3: мыши B6-huTNFR1-k/i получали диету с высоким содержанием жира (FIFD) в течение 20 недель, включая обработку анти-TNFR1 или контрольным антителом (Ab) в течение последних 4 недель. По сравнению с контрольным антителом обработка анти-TNFR1 антителом приводила к значительному снижению активации каспазы-3 в тканях печени. *p<0,05.

Фиг. 4: B6-huTNFR1-k/i-мыши получали диету с высоким содержанием жира (FIFD) в течение 32 недель, включая лечение анти-TNFR1 или контрольным антителом (Ab) в течение последних 8 недель. По сравнению с контрольным антителом лечение анти-TNFR1-Ab привело к значительному улучшению уровней ALT и сывороточного инсулина. * p <0,05

Фиг. 5: Последовательности

SEQ ID NO: 1: VH-CDR1;

SEQ ID NO: 2: VH-CDR2;

SEQ ID NO: 3: VH-CDR3;

SEQ ID NO: 4: VL-CDR1;

SEQ ID NO: 5: VL-CDR2;

SEQ ID NO: 6: VL-CDR3;

SEQ ID NO: 7: VH из IgG13.7/Fab13.7;

SEQ ID NO: 8: VL IgG13.7/Fab13.7;

SEQ ID NO: 9: VH ATROSAB/IZI06.1;

SEQ ID NO: 10: VL ATROSAB/IZI06.1;

SEQ ID NO: 11: (Fab13.7 тяжелая цепь [полужирный шрифт = VH]);

SEQ ID NO: 12: (Fab13.7 легкая цепь [полужирный шрифт = VL]);

SEQ ID NO: 13: VL1C (VL13.7-CH2-CH31; VL- и CH1-содержащая цепь);

SEQ ID NO: 14: VL13.7;

SEQ ID NO: 15: Линкер;

SEQ ID NO: 16: CH2;

SEQ ID NO: 17: CH31: CH31 представляет собой перемежающийся по последовательности константный домен Ig, который включает в основном остатки, происходящие из CH3, но также и остатки из CH1;

SEQ ID NO: 18: VHkC (VH13.7-CH2-CH3-каппа; цепь, содержащая VH и CLk);

SEQ ID NO: 19: VH13.7;

SEQ ID NO:20: CH3k;
 SEQ ID NO: 21: VL1C (VL13.7-CH2-CH31; цепь, содержащая VL и CH1);
 SEQ ID NO: 22: VHkC (VH13.7-CH2-CH3-каппа; цепь, содержащая VH и CLk);
 SEQ ID NO: 23: VH-CDR1 из ATROSAB;
 SEQ ID NO: 24: VH-CDR2 из ATROSAB;
 SEQ ID NO: 25: VH-CDR3 из ATROSAB;
 SEQ ID NO: 26: VL-CDR1 из ATROSAB;
 SEQ ID NO: 27: VL-CDR2 из ATROSAB;
 SEQ ID NO: 28: VL-CDR3 из ATROSAB;
 SEQ ID NO: 29: ATROSAB VH;
 SEQ ID NO: 30: ATROSAB VL;
 SEQ ID NO: 31: IgG1 Fc человека;
 SEQ ID NO: 32: последовательность huTNFR1;
 SEQ ID NO: 33: шарнирная область.

Фиг. 6: Биохимическая характеристика атросимаба (HC: SEQ ID NO: 18, LC: SEQ ID NO: 13). (a) репрезентативное изображение молекулярного состава атросимаба (белый: константные домены Ig, происходящие из Fc; ярко-серый: VH и последовательности, происходящие из CH1; темно-серый: VL и последовательности, происходящие из CLk). Атросимаб характеризовался с помощью SEC (b) TSKgel SuperSW mAb HR, скорость потока 0,5 мл/мин, подвижная фаза $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ и SDS-PAGE (c) Nu-PAGETM 4-12% Bis-TRIS Midi Gel) в восстанавливающих (R) и невосстанавливающих условиях (HP). M: Маркер, (d) Термостабильность атросимаба анализировали путем динамического рассеяния света и визуальной интерпретации полученных данных. Стабильность атросимаба после инкубации в плазме человека анализировали путем определения остаточной активности связывания с TNFR1 человека в ELISA (e). Столбцы представляют значения EC_{50} трех отдельных экспериментов (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Один образец, инкубированный в PBS при 4°C, и один образец, замороженный до -20°C непосредственно после разведения в плазме человека, служили в качестве контролей.

Фиг. 7: Связывание антигена и взаимодействие с рецепторами Fc и белком комплемента Clq. Равновесное связывание атросимаба с TNFR1 человека-Fc анализировали с помощью ELISA ((a) $n = 3$, среднее значение $\pm$ SD). Fab 13.7 (включает идентичные VH и VL) и ATROSAB (бивалентная версия с более низкой аффинностью) служили в качестве контролей. (b) Кинетику связывания в реальном времени регистрировали с помощью QCM при пяти концентрациях от 128 нМ до 4 нМ (с шагом разведения 1:2) с применением алгоритма связывания 1:1 для анализа данных. (c) Взаимодействие иммобилизованного атросимаба, а также двух контрольных белков ATROSAB (недействующий Fc) и ритуксимаб (Fc-часть дикого типа) с человеческими FcγRI, IIb и III, а также с белком комплемента Clq анализировали с помощью ELISA ($n = 2$, среднее значение $\pm$ стандартное отклонение).

Фиг. 8: Антагонистическая биологическая активность атросимаба и отсутствие агонизма. Атросимаб продемонстрировал полное отсутствие агонистической активности в трех различных анализах *in vitro*: (a) высвобождение IL-6 из клеток HeLa, (b) высвобождение IL-8 из клеток HT1080 и в анализе индукции гибели клеток с применением клеток Кум 1 (c). Родительский Fab 13.7, который продемонстрировал полностью агонистические свойства, и двухвалентный IgG ATROSAB, продемонстрировавший незначительные агонистические эффекты в (a) и (b), служили в качестве контрольных белков. Тот же набор белков был проанализирован на предмет способности ингибировать активацию TNFR1 на клеточной поверхности в клетках HeLa, HT1080 и Кум-1, что определялось по высвобождению IL-6 (d), высвобождению IL-8 (e) и индукции гибели клеток (f), соответственно. TNFR1 активировали с применением 0,1 нМ TNF (d и e) или 0,01 нМ TNF (f). Все графики представляют среднее из трех отдельных экспериментов, планки погрешностей указывают SD.

Фиг. 9: Отсутствие агонизма атросимаба в присутствии антител против IgG человека. Активация TNFR1 на поверхности клеток HT1080 атросимабом в присутствии постоянной концентрации (прибл. 15,8 нМ) антител, специфичных для лекарственного средства, анализировали в анализе высвобождения IL-8 с применением трех различных мышиных сывороток против IgG человека (a, b и c). Контролем служили мышиные сыворотки против IgG человека, нестимулированные клетки и TNF (33 нМ). Показано среднее $\pm$ SD трех отдельных экспериментов.

Фиг. 10: Фармакокинетический анализ атросимаба. Циркулирующие концентрации атросимаба определяли в мышиной сыворотке после болюсной инъекции 400 мкг белка у мышей, нокаутированных по C57BL/6J, которые экспрессируют внеклеточный домен человеческого TNFR1, связанный с трансмембранным и внутриклеточным доменом мыши, вместо полностью мышиного белка. Интактный белок определяли при связывании с человеческим TNFR1-Fc в ELISA. График показывает среднее значение $\pm$ SD для пяти мышей.

Подробное описание изобретения

Применение единственного числа и ему подобных, используемые в контексте описания изобретения (особенно в контексте формулы изобретения далее), охватывают как форму единственного числа, так

и множественного, до тех пор, пока в данном документе не указано иное или это очевидно не противоречит контексту.

Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "вмещающий" следует толковать как открытые термины (то есть означающие "включающий, без ограничения указанным"), если не указано иное. Для целей настоящего изобретения термин "состоящий из" считается предпочтительным воплощением термина "включающий". Если в данном документе и далее определено, что группа включает, по меньшей мере, определенное количество воплощений, это подразумевает также включение группы, которая предпочтительно состоит только из этих воплощений.

Под термином "антитело" в данном контексте понимают полипептиды или белки, которые состоят из доменов антител или включают их, которые понимаются как константные и/или переменные домены тяжелых и/или легких цепей иммуноглобулинов с линкерной последовательностью или без нее. Под полипептидами понимаются домены антител, если они включают структуру бета-бочки, состоящую, по меньшей мере, из двух бета-цепей доменной структуры антитела, соединенных последовательностью петли.

Домены антител могут иметь нативную структуру или модифицированы мутагенезом или дериватизацией, например, для модификации антигенсвязывающих свойств или любых других свойств, такие как стабильность или функциональные свойства, такие как связывание с Fc-рецепторами FcRn и/или Fcγ-рецептором.

Используемое в данном документе антитело включает по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, который специфически распознает huTNFR1 или эпитоп huTNFR1. Таким образом, связывание антитела с рецептором huTNFR1 может происходить моновалентно только через один сайт связывания, специфичный для huTNFR1, на антитело, или двухвалентно через два сайта связывания, специфичных для huTNFR1. В частности, антигенсвязывающий сайт состоит из одного или двух доменов антител. Любой из переменных доменов антител один или в комбинации, такой как один домен VH или комбинация доменов VH и VL, можно использовать для создания антигенсвязывающего сайта. В частности, антигенсвязывающий сайт образован комбинацией последовательностей CDR. Такая комбинация последовательностей CDR также понимается как сайт связывания CDR, например, антигенсвязывающий карман, образованный тремя последовательностями CDR одного переменного домена, такими как комбинация CDRH1, CDRH2 и CDRH3, или комбинацией CDRL1, CDRL2 и CDRL3 или еще шестью последовательностями CDR двух переменных доменов, такими как комбинация CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3. Альтернативно, можно использовать антигенсвязывающий сайт, который происходит из природного лиганда к рецептору или из искусственной конструкции. Упомянутые в данном документе последовательности CDR обозначены следующим образом:

CDR домена VH:

VH-CDR1 = CDRH1,

VH-CDR2 = CDRH2,

VH-CDR3 = CDRH3,

CDR домена VL:

VL-CDR1 = CDRL1,

VL-CDR2 = CDRL2,

VL-CDR3 = CDRL3.

В частности, сайт связывания CDR одного переменного домена антитела может быть использован в качестве антигенсвязывающего сайта, такого как сайт связывания переменных доменов тяжелой и легкой цепей (таких как dAb, Fd, VL, Vκappa, Vλ, VH, VHH), или сайт связывания пар переменных доменов антител, такой как пара VH/VL.

Таким образом, антитело, содержащее сайт связывания CDR, может содержать один переменный домен антитела или пару переменных связывающих доменов и необязательно дополнительно содержать другие переменные домены с одинаковой или различной антигенсвязывающей специфичностью, например биспецифическое или полиспецифическое антитело, где только один антигенсвязывающий сайт нацелен на huTNFR1, и по меньшей мере один другой антигенсвязывающий сайт нацелен на мишень, отличную от huTNFR1. Необязательно, конструкция антитела дополнительно включает константные домены антитела или комбинации переменных и/или константных доменов антитела с или без линкерной последовательности или шарнирной области.

Конкретные форматы антител могут быть использованы, как описано в настоящем документе, например, антитело, включающее или состоящее из одного переменного домена антитела, такого как VH, VL или VHH, или комбинаций переменных и/или константных доменов антитела с или без связывающей последовательности или шарнирной области, включая пары переменных доменов антител, таких как пара VL/VH, антитело, содержащее или состоящее из пары доменов VL/VH и константных доменов антител, таких как антитела с тяжелой цепью, Fab, F(ab'), (Fab)₂, scFv, Fd, Fv или полноразмерное антитело, например, типа IgG (например, подтипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), антитела IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM. Термин "полноразмерное антитело" можно использовать для обозначения любой молекулы антитела, содержащей, по меньшей мере, большую часть Fc-домена и других доменов, обычно встречаю-

щихся в природном мономере антитела. Эта фраза используется в данном документе, чтобы подчеркнуть, что конкретная молекула антитела не является фрагментом антитела.

Примерами моновалентных моноспецифических связующих являются Fab, scFv, Fv, доменные антитела, полу-антитела IgG или моновалентные IgG, такие как одноплечевой IgG, состоящий из полной легкой цепи, одной полной тяжелой цепи и дополнительной цепи Fc, в которой отсутствует Fd ($Fd = VH\text{-}CH1$), который может быть получен в соответствии с методикой "выступ-в-углубление" (или другими асимметричными частями Fc), чтобы избежать гомодимеризации доменов Fc.

Типичными двух- или поливалентными связующими являются полноразмерные антитела любого из типов иммуноглобулинов или фрагмент антигенсвязывающего антитела любого из полноразмерных антител, который включает по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, например, любой один или несколько Fab, F (ab'), (Fab)₂, scFv или Fv.

Термин "Fv" в данном документе понимается как область переменных доменов, которая включает сайт связывания CDR, например, VH, VL или VH/VL. Термин "Fv", таким образом, в частности относится к VH, VL или VH/VL, который является доменом VH, связанным с доменом VL взаимодействием между структурой бета-листа обоих переменных доменов, с линкером или без него.

Используемый в данном документе термин "антитело", в частности, включает антитела в выделенной форме в препарате антитела, которые по существу не содержат других антител, нацеленных против других антигенов-мишеней или содержащих другое структурное расположение доменов антител. Тем не менее, выделенное антитело может содержаться в комбинированном препарате, содержащем комбинацию выделенного антитела, например, по меньшей мере, с одним другим антителом, таким как моноклональные антитела или фрагменты антител, имеющие другие специфичности.

Термин "антитело" должен применяться к антителам животного происхождения, включая человеческие антитела, такие как антитела млекопитающих, таких как человек или мышь, или антитела птиц, таких как курица, причем этот термин должен, в частности, включать рекомбинантные антитела, основанные на последовательности животного происхождения, например, человеческие последовательности, подобные человеческим антителам. Человеческие антитела обычно содержат переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Предпочтительно используемые человеческие антитела, описанные в данном документе, могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человеческого иммуноглобулина зародышевой линии (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR. Человеческие антитела включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека.

Тем не менее, термин "антитело" далее применяется к химерным антителам с последовательностями, происходящими из различных видов, например, с последовательностями мышинного и человеческого происхождения, или к гуманизированным антителам, которые содержат аминокислотные последовательности человеческого происхождения и аминокислотные последовательности, не принадлежащие человеку, например, из грызунов.

Термин "антитело" в частности относится к антителам любого 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 некоторые из них могут быть далее разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Термин кроме того применяется к моноклональным или поликлональным антителам, в частности к рекомбинантному антителу, которое включает все антитела и структуры антител, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как антитела, происходящие от животных, например млекопитающих, включая человека, которые включают гены или последовательности различного происхождения, например мышинные, химерные, гуманизированные антитела или антитела, полученные из гибридомы. Дополнительные примеры относятся к антителам, выделенным из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, или к антителам, выделенным из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител или доменов антител, или к антителам, полученным, экспрессированным, созданным или выделенным любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена антитела к другим последовательностям ДНК.

Домены антител могут иметь нативную структуру или модифицироваться мутагенезом или дериватизацией, например, для модификации антигенсвязывающих свойств или любых других свойств, таких как стабильность или функциональные свойства, такие как связывание с Fc-рецепторами FcRn и/или Fcγ-рецептором (FCGR).

Конкретные примеры относятся к не встречающимся в природе антителам, которые являются искусственными конструкциями, сконструированными для специфического распознавания целевого hT-NFR1, по меньшей мере, одним антигенсвязывающим сайтом, который включает одну или несколько искусственных последовательностей CDR, или сконструированными для получения не встречающихся в природе конструкций антител, которые имеют структуру, отличную от любой встречающейся в природе структуры иммуноглобулина.

Конкретные примеры антител, описанных далее, не встречаются в природе, например, как предусмотрено в комбинированном составе с другим антителом или активным агентом, комбинация которых не встречается в природе. Конкретные дополнительные примеры относятся к искусственному производному или варианту встречающегося в природе антитела, или оптимизированному или аффинно-зрелому варианту встречающегося в природе антитела, или к антителу с каркасной областью, которая разработана для улучшения стабильности антитела. Посредством такой оптимизации или конструирования антитело включает одну или несколько синтетических структур или последовательностей или характеристик, которые не обнаруживаются в контексте антитела в природе.

Понятно, что термин "антитело", используемый в данном документе, также относится к производным антитела, в частности, к функционально активным производным, в настоящем документе также упоминаемым как функциональные варианты антител.

Функционально активные производные, в частности, получают путем слияния или ковалентной химической модификации, которая не изменяет первичную аминокислотную последовательность самого антитела. Производные могут, например, иметь искомые свойства, включая, например, продление периода полувыведения из кровотока, повышение стабильности, уменьшение клиренса или изменение иммуногенности. Под производными конкретных антител понимают любую комбинацию одного или нескольких доменов антител или антител и/или гибридного белка, где любой домен антитела может быть слит в любом положении одного или нескольких других белков, таких как другие антитела, например, связывающая структура, включающая петли CDR, полипептид рецептора, а также лиганды, каркасные белки, ферменты, токсины и т.п. Производное антитела может быть получено путем ассоциации или связывания с другими веществами различными химическими методами, такими как ковалентное связывание, электростатическое взаимодействие, дисульфидное связывание и т.д. Другими веществами, связанными с антителом, могут быть липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты, органические и неорганические молекулы или любая их комбинация (например, ПЭГ, пролекарства или лекарственные средства). В конкретном воплощении антитело представляет собой производное, содержащее лекарственное средство, например, для получения конъюгата антитело-лекарственное средство.

Термин "производное" также включает фрагменты, варианты, аналоги или гомологи антител, например, со специфическим паттерном гликозилирования, например, продуцируемым гликоинженерией, которые являются функциональными и могут служить функциональными вариантами, например, связываться с конкретной мишенью.

Термин "гликоинженерный" в отношении последовательностей антител должен относиться к вариантам гликозилирования, имеющим модифицированные иммуногенные свойства, ADCC и/или CDC как результат гликоинженерии. Все антитела содержат углеводные структуры в консервативных положениях в константных областях тяжелой цепи, причем каждый изотип обладает различным набором N-связанных углеводных структур, которые по-разному влияют на сборку белка, секрецию или функциональную активность. Антитела типа IgG1 представляют собой гликопротеины, которые имеют консервативный N-связанный сайт гликозилирования в Asn297 в каждом домене CH2. Два сложных двухантенных олигосахарида, прикрепленных к Asn297, погружены между доменами CH2, образуя обширные контакты с полипептидным остовом, и их присутствие необходимо для того, чтобы антитело обеспечивало эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC). Удаление N-гликана в N297, например, путем мутации N297, например, на A или T299, обычно приводит к агликозильрованным антителам со сниженным ADCC.

Существенные различия в гликозилировании антител происходят между клеточными линиями, и даже незначительные различия наблюдаются для данной клеточной линии, выращенной в различных условиях культивирования. Экспрессия в бактериальных клетках обычно обеспечивает агликозильрованное антитело.

Антитела могут быть лишены активного фрагмента Fc и, таким образом, либо состоят из доменов антител, которые не имеют сайта связывания FCGR, в частности включая любое антитело, лишенное цепи доменов CH2 и CH3, либо содержат домены антител, лишенные эффекторной функции Fc, например модификациями для снижения эффекторных функций Fc, в частности, для отмены или снижения активности ADCC и/или CDC. Такие модификации могут быть вызваны мутагенезом, например, мутациями в сайте связывания FCGR или производными или агентами, которые влияют на ADCC-и/или CDC-активность антитела, чтобы достичь снижения эффекторной функции Fc или отсутствия эффекторной функции Fc, что обычно понимается как относящаяся к эффекторной функции Fc менее чем 10% немодифицированного антитела (дикого типа), предпочтительно менее 5%, что измеряется по активности ADCC и/или CDC.

Типичные антитела могут содержать фрагмент Fc или, по меньшей мере, часть фрагмента Fc, например, для поддержания сайта связывания с FcRn, тем самым получая антитело с существенным периодом полувыведения *in vivo*.

Тем не менее, Fc может быть модифицирован для получения снижения возможной активности ADCC и/или CDC, например, путем переключения IgG1 на подтип IgG2 или модификациями для уменьшения связывания с рецептором Fc, например, E233P, и/или L234V, и/или L235A, и/или D265G, и/или

A327Q, и/или A330A, и/или G236, делецией и/или A327G, и/или A330S в Fc IgG1 человека, где нумерация соответствует Kabat [EU-индекс].

Дополнительные примеры относятся к модификации для снижения иммуногенности, например, посредством нокаута сайта гликозилирования, такого как N297Q, что обеспечивает нарушенное связывание с рецептором лектина.

Понятно, что термин "антитело" также относится к вариантам антитела, включая антитела с функционально активными вариантами CDR родительской последовательности CDR и функционально активными вариантами антител родительского антитела. Например, функциональные варианты тех антител, которые характеризуются связывающими последовательностями CDR и/или последовательностями тяжелой и легкой цепи, представленными в настоящем документе, могут быть сконструированы и использованы, как описано далее в настоящем документе.

В частности, вариант антитела родительского антитела может быть получен путем конструирования по меньшей мере одной из последовательностей антитела родительского антитела, такой как любой из приведенных в данном документе примеров антител, например, где вариант антитела включает по меньшей мере 3 CDR вариабельной области тяжелой цепи и, необязательно, дополнительно по меньшей мере 3 CDR вариабельной области легкой цепи, по меньшей мере, с одной точечной мутацией, по меньшей мере, в одной из CDR или в областях FR, или в константной области тяжелой цепи (HC) или легкой цепи (LC), и при этом все еще сохраняет функциональную активность, что измеряется по специфическому связыванию с мишенью huTNFR1.

В частности, вариант антитела представляет собой мутантное антитело или фрагмент антитела, например, полученный методами мутагенеза, в частности, для удаления, обмена, введения вставок в специфическую аминокислотную последовательность или область антитела или для химической дериватизации аминокислотной последовательности, например, в константных доменах для формирования стабильности, эффекторной функции или периода полувыведения антитела или в вариабельных доменах для улучшения антигенсвязывающих свойств, например, с помощью методов созревания аффинности, доступных в данной области. Можно использовать любой из известных способов мутагенеза, включая точечные мутации в искомым положениях, например, полученных методами рандомизации. В некоторых случаях положения выбираются случайным образом, например, с любой из возможных аминокислот или с помощью выбора предпочтительных аминокислот для рандомизации последовательностей антител. Термин "мутагенез" относится к любому признанному в данной области методу для изменения полинуклеотидной или полипептидной последовательности. Предпочтительные типы мутагенеза включают мутагенез на основе ПЦР с внесением ошибок, насыщенный мутагенез или другой сайт-направленный мутагенез.

Точечную мутацию конкретно понимают как создание полинуклеотида, который приводит к экспрессии аминокислотной последовательности, которая отличается от аминокислотной последовательности, не подвергнутой конструированию, заменой или обменом, делецией или вставкой одной или нескольких единичных (непоследовательных) или пар аминокислот в отношении различных аминокислот.

В частности, функционально активное вариантное антитело получают путем модификации родительского антитела или последовательности родительского антитела с помощью любой одной или нескольких из числа вставки, делеции или замены одной или нескольких аминокислот или химической дериватизации одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности или нуклеотидов в нуклеотидной последовательности или на одном или обоих дистальных концах последовательности, например, N-концевых и/или C-концевых 1, 2, 3 или 4 аминокислот в последовательности CDR и/или центральных 1, 2, 3 или 4 аминокислот (то есть в середине последовательности CDR), и при этом модификация не влияет, в частности, не ухудшает активность этой последовательности. В случае, когда сайт связывания обладает специфичностью к выбранному антигену-мишени, функционально активный вариант антитела будет по-прежнему обладать заранее определенной специфичностью связывания или практически такой же биологической активностью, хотя это можно изменить, например, для изменения тонкой специфичности к определенному эпитопу, аффинности, авидности, скорости Кон или Koff и т.д. Например, аффинно-зрелое антитело определенно понимается как функционально активный вариант антитела. Следовательно, модифицированная последовательность CDR в аффинно-зрелом антителе понимается как функционально активный вариант CDR.

Созревание аффинности - это процесс, при котором образуются антитела с повышенной аффинностью к целевому антигену. Любой один или несколько способов получения и/или применения библиотек аффинного созревания, доступных в данной области, могут быть использованы для того, чтобы получить аффинно-зрелые антитела в соответствии с различными воплощениями изобретения, раскрытого в данном документе. Примерами таких способов и применений созревания аффинности являются неспецифический мутагенез, пассирование бактериальных мутаторных штаммов, сайт-направленный мутагенез, направленное воздействие на горячие точки мутагенеза, экономный мутагенез, шафлинг антител, шафлинг легких цепей, шафлинг тяжелых цепей, мутагенез CDR1 и/или CDR1, и способы получения и применения библиотек аффинного созревания, подходящих для реализации способов и применений в соответствии с различными воплощениями изобретения, раскрытого в данном документе, включают, напри-

мер, те, которые раскрыты в: Wark & Hudson, 2006, *Advanced Drug Delivery Reviews* 58: 657-670.

С помощью структурных изменений антитела, включая аминокислотный мутагенез или как следствие соматическую мутацию в сегментах гена иммуноглобулина, создаются варианты сайта связывания с антигеном и отбираются для большей аффинности. Аффинно-зрелые антитела могут проявлять в несколько раз большую аффинность, чем родительское антитело. Одиночные родительские антитела могут подвергаться созреванию аффинности. Альтернативно, пулы антител со сходной аффинностью связывания с антигеном-мишенью могут рассматриваться как родительские структуры, которые варьируют для получения аффинно-зрелых отдельных антител или аффинно-зрелых пулов таких антител.

Предпочтительный вариант аффинно-зрелого антитела, описанный в настоящем документе, демонстрирует, по меньшей мере, 2-кратное увеличение аффинности связывания, предпочтительно, по меньшей мере, 5-кратное, предпочтительно, по меньшей мере, 10-кратное, предпочтительно, по меньшей мере, 50-кратное или предпочтительно, по меньшей мере, 100-кратное увеличение. Созревание аффинности может быть использовано в ходе кампаний селекции с применением соответствующих библиотек родительских молекул, с антителами, обладающими средней аффинностью связывания, для получения антитела, описанного в данном документе. Альтернативно, аффинность может быть еще более увеличена путем созревания аффинности антитела, описанного в настоящем документе, для получения высоких значений, соответствующих KD, составляющих менее 10^{-10} М или даже менее 10^{-11} М.

В некоторых воплощениях аффинность связывания определяют с помощью анализа аффинного ELISA. В некоторых воплощениях аффинность связывания определяют с помощью анализов BIAcore, ForteBio или MSD. В некоторых воплощениях аффинность связывания определяют кинетическим способом. В некоторых воплощениях аффинность связывания определяют способом равновесия/растворения. В некоторых воплощениях аффинность связывания определяют с помощью стандартных измерений пьезоэлектрического микровзвешивания (QCM), в частности, при заданных условиях, которые напоминают физиологические условия (около 37°C, плотность около 50 Гц).

Специфическая функция антител, описанная в данном документе, представляет собой функцию в качестве ингибитора (также называемого антагонистом) взаимодействия TNF-huTNFR1. Термин "ингибитор", как он понимается в данном документе, представляет собой вещество, обладающее способностью

- а) модулировать (например, уменьшать или устранять) передачу сигналов TNFR1 *in vitro* и/или *in vivo*, и/или
- б) ингибировать опосредованную TNFR1 гибель клеток *in vitro* и/или *in vivo*, и/или
- с) ингибировать опосредованную TNF клеточную стимуляцию для высвобождения воспалительных цитокинов *in vitro* и/или *in vivo*,
- д) путем ингибирования передачи сигналов TNFR1 посредством другого механизма.

В частности, антитело в том виде, в котором оно используется в данном документе, препятствует связыванию одной или нескольких молекул TNF с одной или несколькими молекулами TNFR1 на поверхности клетки. Для терапевтического применения, не желая быть связанными теорией, полагаем, что ингибиторы взаимодействия TNF-huTNFR1 могут обладать способностью ингибировать передачу сигналов huTNFR1 в присутствии TNF или опосредованную huTNFR1 гибель клеток в присутствии TNF или ингибировать клеточную стимуляцию для высвобождения воспалительных цитокинов в присутствии TNF.

Используемый в данном документе термин "активация сигнального пути" и "передача сигналов" представляет собой биохимический процесс, включающий передачу внеклеточных стимулов через рецепторы клеточной поверхности через определенный и последовательный ряд молекул к генам в ядре, что приводит к специфическим клеточным реакциям на стимулы.

Ингибирование взаимодействия huTNFR1 может привести к понижающей модуляции эффектов передачи сигналов TNFR1 или трансдукции сигнала, измеренной *ex vivo* в анализе на основе клеток или *in vivo*, в зависимости от дозы. Функциональная активность антитела, описанного в настоящем документе, конкретно характеризуется ингибирующей функцией, которая ингибирует взаимодействие TNF-huTNFR1 или взаимодействие LT α -huTNFR1 *in vivo*, что определяется в анализе на основе клеток *ex vivo*. Дополнительный анализ может быть использован для исключения существенных побочных эффектов, связанных с перекрестным связыванием рецептора TNFR1, которое может действовать агонистически на взаимодействие TNF-TNFR1. Подходящим анализом является определение активности антитела или варианта на клетках HeLa или HT1080 по отсутствию стимулирующей активности по выработке воспалительных цитокинов IL-6 или IL-8, соответственно. Примерный тест описан в разделе примеров ниже.

Ингибирование обычно приводит к снижению эффектов взаимодействия или активности huTNFR1 по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90%, или на максимальный уровень. Способы получения и характеристики антител, описанные в данном документе, хорошо известны в данной области. В предпочтительном воплощении варианты антител получают и подвергают скринингу на предварительно опреде-

ленные свойства, используя один или несколько клеточных анализов с применением клеток, экспрессирующих huTNFR1, или анализов *in vivo*. Для таких анализов антитело обычно добавляют экзогенно, так что клетки могут быть связаны, например, в присутствии и отсутствии TNF для определения антагонистической и агонистической активности. Эти анализы обычно основаны на функции иммуноглобулина; то есть способности антитела связываться с huTNFR1 и опосредовать некоторое биохимическое событие, например блокирование связывания TNF с указанными клетками, например, в конкурентном анализе связывания, ингибирование связывания TNF/рецептора, снижение экспрессии цитокинов в присутствии или отсутствии TNF, в частности, воспалительных интерлейкинов, таких как IL-6 или IL-8, апоптоз и т.п.

Описанное в настоящем документе антитело предпочтительно обладает только антагонистической активностью в отношении TNF (в частности, без обнаруживаемой агонистической активности), таким образом, уменьшая воспалительную реакцию, вызванную повышенным уровнем TNF в кровотоке, что может привести к нежелательным воспалительным реакциям, апоптозу и некрозу или органной недостаточности. Предпочтительное антитело обладает антагонистической активностью, соответствующей IC₅₀ менее 100 нМ, предпочтительно менее 20 нМ, более предпочтительно менее 10 нМ, наиболее предпочтительно в наномолярном диапазоне с однозначным числом или менее, что измерено в анализе на основе клеток с применением TNF или LT-альфа с полумаксимальной концентрацией насыщения, предпочтительно в диапазоне 0,01-0,1 нМ TNF и LT-альфа, соответственно.

Потенциальная агонистическая активность миметика TNF может быть измерена в том же клеточном анализе, но без использования TNF. Описанное в данном документе антитело предпочтительно не обладает значительной агонистической активностью, если инкубация клеток HeLa или HT1080 в отсутствие TNF приводит к отсутствию или только незначительной индукции цитокина, например, повышенные уровни IL-6 или IL-8 менее 0,5 нг/мл при концентрации, по меньшей мере, 5 нМ или около 10 нМ антитела. Предпочтительно отсутствует или имеется только незначительная или отрицательная продукция цитокинов, которая может быть определена количеством менее 10 пг/10⁵ клеток. В предпочтительном примере экспрессия и высвобождение цитокинов составляет менее 2,5 пг/100000 клеток в течение 18 часов. Предпочтительно агонистическая активность, таким образом, ниже базового уровня или менее 2% ответа от сопоставимой концентрации TNF, предпочтительно менее 1% эквивалентного или максимального ответа TNF.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" по отношению к последовательностям антител, описанным в настоящем документе, определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введение пропусков, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей, при этом не рассматривая какие-либо консервативные замены как часть идентичности последовательностей. Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Используемый в данном документе термин "антиген" является взаимозаменяемым с терминами "мишень" или "антиген-мишень" и относится к целой молекуле-мишени или фрагменту такой молекулы, распознаваемой сайтом связывания антитела. В частности, субструктуры антигена, например, структура полипептида или углевода, обычно называемая "эпитопами", например, вирусные эпитопы или Т-клеточный эпитоп, которые являются иммунологически релевантными, могут распознаваться по такому сайту связывания. Антиген huTNFR1 представляет собой антиген, включающий рецепторные структуры, который способен специфически связывать тримерный TNF или LTα в качестве моно- или мультимерного рецептора цитокинов на поверхности большинства клеток человека.

Используемый в данном документе термин "huTNFR1" относится к рецептору TNF, CD120a TNFR1 (p55/60, суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей TNFRSF1A, представитель 1A [Homo sapiens (человек)], ID гена: 7132), экспрессируемого повсеместно в большинстве клеток человека. Конкретная примерная последовательность huTNFR1 представлена в виде SEQ ID NO: 32.

Используемый в данном документе термин "эпитоп", в частности, относится к молекулярной структуре, которая может полностью составлять специфического партнера по связыванию или быть частью конкретного партнера по связыванию с сайтом связывания антитела. Эпитоп может состоять из углевода, пептидной структуры, жирной кислоты, органического, биохимического или неорганического вещества, или его производных и любых их комбинаций. Если эпитоп включен в пептидную структуру, такой как пептид, полипептид или белок, он обычно будет включать, по меньшей мере, 3 аминокислоты, предпочтительно от 5 до 40 аминокислот и более предпочтительно от 10 до 10 аминокислот. Эпитопы могут быть линейными или конформационными. Линейный эпитоп состоит из одного сегмента первичной последовательности полипептидной или углеводной цепи. Линейные эпитопы могут быть смежными или перекрывающимися.

Конформационные эпитопы состоят из аминокислот или углеводов, соединенных вместе путем сворачивания полипептида с образованием третичной структуры, и аминокислоты необязательно соседствуют друг с другом в линейной последовательности.

В частности, и касательно полипептидных антигенов, конформационный или прерывистый эпитоп характеризуется наличием двух или более отдельных аминокислотных остатков, разделенных в первичной последовательности, но собирающихся в последовательную структуру на поверхности молекулы, когда полипептид складывается в нативный белок/антиген.

В данном документе термин "эпитоп" будет, в частности, относиться к эпитопу, содержащемуся в huTNFR1, который представляет собой эпитоп, включенный в мембранно-дистальный CRD1 и субдомен A1 из CDR2 в huTNFR1.

Термин "выделенный" или "выделение", используемый в данном документе в отношении нуклеиновой кислоты, антитела или другого соединения, должен относиться к такому соединению, которое было достаточно отделено от среды, с которой оно было бы естественным образом связано, чтобы существовать "по существу в чистой" форме. "Выделенный" не обязательно означает исключение искусственных или синтетических смесей с другими соединениями или материалами, или присутствие примесей, которые не влияют на фундаментальную активность, и которые могут присутствовать, например, из-за неполной очистки.

Касательно полипептидов или белков, таких как выделенные антитела, описанные в данном документе, термин "выделенный" будет в частности относиться к соединениям, которые не содержат или практически не содержат материал, с которым они связаны в природе, такие как другие соединения, с которыми они встречаются в их естественной среде или среде, в которой они получены (например, культуре клеток), когда при таком получении используют технологию рекомбинантных ДНК, практикуемую *in vitro* или *in vivo*. Выделенные соединения могут быть включены в состав с разбавителями или адъювантами и, тем не менее, для практических целей могут быть выделены - например, полипептиды или полинуклеотиды могут быть смешаны с фармацевтически приемлемыми носителями или наполнителями при использовании в диагностике или терапии.

Используемый в данном документе термин "рекомбинантный" означает "получаемый с помощью генной инженерии или полученный в результате генной инженерии". Рекомбинантный хозяин, в частности, включает экспрессирующий вектор экспрессии или клонирующий вектор, или рекомбинантный хозяин был генетически сконструирован так, чтобы содержать последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, в частности, с применением нуклеотидной последовательности, чужеродной для хозяина. Рекомбинантный белок получают путем экспрессии соответствующей рекомбинантной нуклеиновой кислоты в хозяине.

Антитело, дополнительно описанное в данном документе, может представлять собой рекомбинантное антитело. С этой целью термин "рекомбинантное антитело" в контексте настоящего описания включает антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такими как (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным для генов иммуноглобулина человека или полученных из них гибридом, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека или библиотеки антигенсвязывающих последовательностей антитела и (d) антител, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела включают антитела, сконструированные так, чтобы включать перестройки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антител. В соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы общепринятые способы молекулярной биологии, микробиологии и рекомбинантных ДНК, известные специалистам в данной области. Такие методы в полной мере описаны в литературе. См., например, Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1982).

Описанное в данном документе антитело предпочтительно предлагается в виде рекомбинантного белка, продуцируемого рекомбинантной системой экспрессии, использующей клетку-хозяина, например, путем экспрессии в периплазматическом пространстве *E.coli* или путем экспрессии в качестве секретлируемого белка в эукариотической системе экспрессии, такой как дрожжи или млекопитающие, например, CHO, HEK или в линиях продуцирующих человеческих клеток-хозяев.

Клетки яичника китайского хомячка (CHO) чаще всего используются для выработки антител. В дополнение к предоставлению подходящих паттернов гликозилирования, эти клетки обеспечивают последовательную генерацию генетически стабильных, высокопродуктивных клональных клеточных линий. Они могут культивироваться до высоких плотностей в простых биореакторах с применением бессывороточных сред и позволяют разрабатывать безопасные и воспроизводимые биологические процессы.

Клетки-хозяева являются наиболее предпочтительными, когда они создаются, адаптируются и полностью культивируются в бессывороточных условиях и, необязательно, в средах, не содержащих какого-либо белка/пептида животного происхождения.

"Специфическое" связывание, распознавание или нацеливание в контексте настоящего описания означает, что связующее, например антитело или антигенсвязывающий сайт антитела, проявляет заметную аффинность к антигену-мишени или соответствующему эпитопу в гетерогенной популяции моле-

кул. Таким образом, при определенных условиях (например, при иммуноанализе) связывающее специфически связывается с антигеном-мишенью и не связывается в значительном количестве с другими молекулами, присутствующими в образце. Специфическое связывание означает, что связывание является селективным с точки зрения идентификации цели, с высокой, средней или низкой аффинностью или авидностью связывания, в зависимости от выбора. Селективное связывание обычно достигается, если константа связывания или динамика связывания, по меньшей мере, в 10 раз отличаются (понимается как разница, по меньшей мере, в 1 log), предпочтительно, отличаются, по меньшей мере, в 100 раз (понимается как разница, по меньшей мере, в 2 log) и более предпочтительнее отличаются, по меньшей мере, в 1000 раз (понимается как разница не менее 3 log) по сравнению с другой мишенью. Дифференциальное связывание может быть определено иммуноанализом, предпочтительно иммуноблоттингом, ELISA или другими иммунологическими способами. Специфичность молекулы антитела к конкретной мишени можно определить с помощью конкурентных анализов, например, как описано в Harlow, et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988). Селективное связывание может быть разработано или улучшено методами оптимизации рекомбинантных антител, известными в данной области. Например, некоторые области переменных областей цепей иммуноглобулина, описанных в настоящем документе, могут подвергаться одной или нескольким стратегиям оптимизации, включая шафлинг легкой цепи, направленный мутагенез, слияние CDR и направленный мутагенез выбранных областей CDR и/или каркасных областей.

Применение термина "обладающие одинаковой специфичностью", "имеющие один и тот же сайт связывания" или "связывающие один и тот же эпитоп" указывает на то, что эквивалентные моноклональные антитела проявляют одинаковые или, по существу, одинаковые, то есть сходные иммунореакционные (связывающие) характеристики и конкурируют за связывание с предварительно выбранной последовательностью связываемой мишени. Относительная специфичность молекулы антитела для конкретной мишени может быть относительно определена конкурентными анализами, например, как описано в Harlow, et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988).

Конкуренция в настоящем документе означает относительное ингибирование более чем около 30%, определенное анализом конкурентного ELISA или анализом ForteBio. Целесообразным может быть установление более высокого порога относительного ингибирования в качестве критерия того, что является подходящим уровнем конкуренции в конкретном контексте, например, когда конкурентный анализ используется для выбора или скрининга новых антител, разработанных с предполагаемой функцией связывания антигена. Таким образом, например, можно установить критерии конкурентного связывания, при которых обнаруживается относительное ингибирование по меньшей мере 40%, 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%, прежде чем антитело будет считаться достаточно конкурентным.

Используемый в данном документе термин "пациент" относится к людям и другим млекопитающим. В частности, медицинское применение, описанное в настоящем документе, или соответствующий способ лечения применяется к объекту, нуждающемуся в профилактике или лечении NASH, или заболевании, связанном с NASH. Объектом может быть пациент с риском развития или страдающим от NASH, в том числе на ранней или поздней стадии заболевания. Термин "пациент" конкретно включает субъектов, которые получают профилактическое и/или терапевтическое лечение. Таким образом, термин "лечение" включает как профилактическое, так и терапевтическое лечение.

В частности, термин "терапия" относится к терапевтическим мерам, которые предназначены для охвата введения для лечения заболевания или уменьшения симптомов заболевания.

В частности, термин "профилактика" относится к профилактическим мерам, которые предназначены для снижения риска возникновения заболевания или рецидива заболевания.

Термин "терапевтически эффективное количество" используется в данном документе взаимозаменяемо с любым из терминов "эффективное количество" или "достаточное количество" соединения, например, антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой количество или активность, достаточные для того, чтобы при введении субъекту оказывать полезные или желаемые результаты, включая клинические результаты, и, в силу этого, его эффективное количество или синоним зависит от контекста, в котором оно применяется.

Под эффективным количеством подразумевается такое количество соединения, которое достаточно для лечения, профилактики или ингибирования таких заболеваний или расстройств. В контексте заболевания терапевтически эффективные количества антитела, описанного в настоящем документе, специально используются для лечения, модуляции, ослабления, реверсии или воздействия на заболевание или состояние, которое выигрывает от ингибирования взаимодействия TNF-TNFR1.

Количество соединения, которое будет соответствовать такому эффективному количеству, будет варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как данное лекарственное средство или соединение, фармацевтическая композиция, способ введения, тип заболевания или расстройства, отличительные особенности объекта или хозяина, подвергаемого лечению, и т.п., но, тем не менее, может быть определен обычным специалистом в данной области.

Как дополнительно описано в настоящем документе, способ лечения пациента включает стадию введения терапевтически эффективного количества определенного выше антитела huTNFR1 пациенту, нуждающемуся в этом. Терапевтически эффективное количество обычно находится в диапазоне 0,5-500 мг, предпочтительно 1-400 мг, еще более предпочтительно до 300 мг, до 200 мг, до 100 мг или до 10 мг, хотя могут быть указаны более высокие дозы, например для лечения пациентов с ожирением или острых состояний заболеваний.

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

В одном воплощении антитело, описанное в данном документе, является единственным терапевтически активным агентом, вводимым пациенту. Альтернативно, антитело, описанное в данном документе, вводят в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими агентами, включая, без ограничения указанным, антагонисты TNF, противовоспалительные агенты, цитокины, факторы роста или другие терапевтические агенты. Антагонистическое антитело к TNFR1 можно вводить одновременно или последовательно с одной или несколькими другими схемами лечения, предпочтительно с терапией против TNF, такой как антитела против TNF. Антитело, описанное в данном документе, предпочтительно вводят пациенту в качестве лечения первой линии или в качестве терапии второй линии, когда анти-TNF-терапия неэффективна, как неотложного, так и длительного лечения. Особенно предпочтительным медицинским применением является лечение хронического заболевания.

Кроме того, режим лечения или профилактики объекта с помощью терапевтически эффективного количества антитела, описанного в данном документе, может состоять из однократного введения или, альтернативно, включать ряд применений. Например, антитело можно вводить, по меньшей мере, один раз в год, по меньшей мере один раз в полгода или по меньшей мере один раз в месяц. Однако в другом воплощении антитело может вводиться субъекту от примерно одного раза в неделю до примерно ежедневного введения для данного лечения. Продолжительность периода лечения зависит от множества факторов, таких как тяжесть заболевания, острого или хронического заболевания, возраст пациента, концентрация и активность формы антитела. Также должно быть понятно, что эффективная дозировка, используемая для лечения или профилактики, может увеличиваться или уменьшаться в течение определенного режима лечения или профилактики. Изменения в дозировках могут иметь результат и становятся очевидными с помощью стандартных диагностических анализов, известных в данной области. В некоторых случаях может потребоваться длительное введение.

"Неалкогольный стеатогепатит (NASH)" представляет собой заболевание печени, не связанное с употреблением алкоголя, характеризующееся жировым перерождением гепатоцитов, сопровождающимся внутрилобулярным воспалением и фиброзом. NASH является распространенным, часто "тихим" заболеванием печени. Это заболевание напоминает алкогольное заболевание печени, но встречается у людей, которые пьют мало или вообще не употребляют алкоголь. Три основных признака характеризуют NASH и отличают его от других заболеваний печени метаболического происхождения: аномальное накопление жира или отложение в печени (стеатоз печени), воспаление печени и повреждение печени или повреждение ткани печени (фиброз).

NASH является потенциально серьезным заболеванием, которое несет существенный риск прогрессирования до терминальной стадии заболевания печени, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы. Некоторые пациенты, у которых развивается цирроз печени, подвержены риску печеночной недостаточности и в конечном итоге им может потребоваться пересадки печени. NAFLD может отличаться от NASH по шкале активности NAFLD (NAS), сумме баллов гистопатологии биопсии печени при стеатозе (от 0 до 3), лобулярном воспалении (от 0 до 2) и гепатоцеллюлярном баллонировании (от 0 до 2). NAS <3 соответствует NAFLD, 3-4 соответствует пограничному NASH и > 5 соответствует NASH. Биопсия также оценивается на фиброз (от 0 до 4).

При использовании в настоящем документе пациент, страдающий от NASH, является пациентом с NASH, или ему был поставлен диагноз NASH, или пациент генетически предрасположен к развитию NASH, или пациент может быть предрасположен к развитию NASH, потому что он или она страдает от метаболического синдрома, ожирения, диабета или преддиабета. В других воплощениях пациент, страдающий от NASH, является пациентом, который был протестирован и у которого были обнаружены клинические признаки, характерные для NASH (ненормальное накопление жира в печени, воспаление печени и фиброз печени), даже если он или она могут пока не проявлять никаких физических симптомов NASH. В некоторых случаях у пациента, страдающего NASH, появляются симптомы NASH, хотя диагноз еще не поставлен.

Лечение NASH может привести к замедлению или остановке прогрессирования NASH в цирроз печени. Некоторые схемы лечения направлены на задержку появления физического симптома или набора физических симптомов или клинических проявлений, или признаков, связанных с NASH. В некоторых воплощениях лечение приводит к улучшению, по меньшей мере, одного измеримого физического сим-

птома NASH, такого как, например, потеря массы, слабость или усталость. В других воплощениях лечение приводит к улучшению, по меньшей мере, одного клинического параметра или признака NASH, такого как, например, ненормальное накопление жира в печени, фиброз печени, определяемый по биопсии, воспалению печени, аномальным уровням ферментов печени (например, ALT) аномальные уровни воспалительных цитокинов или балл NAS. В других воплощениях лечение приводит к снижению, ингибированию или замедлению прогрессирования NASH, либо физически, например, путем стабилизации измеримого симптома или набора симптомов (таких как усталость, потеря массы или слабость), либо клинически/физиологически, например, посредством стабилизации измеряемого параметра, такого как ненормальное накопление жира в печени, аномальные уровни ферментов печени, аномальные уровни маркеров воспаления печени, аномальные результаты при биопсии печени, оценка NAS или то и другое. В другом воплощении лечение также может приводить к предотвращению причины и/или последствий или клинического проявления NASH или одного из симптомов, возникших в результате NASH, до того, как заболевание или расстройство полностью проявится. В некоторых воплощениях лечение приводит к увеличению выживаемости или времени выживания у пациента с NASH. В некоторых воплощениях лечение приводит к снижению вероятности для пациента с NASH потребности в пересадке печени. В других воплощениях лечение приводит к устранению необходимости для пациента NASH подвергаться пересадке печени. В других воплощениях лечение приводит к снижению вероятности развития цирроза у пациента с NASH. В других воплощениях лечение приводит к предотвращению прогрессирования цирроза печени, определяемого гистологией.

Конкретные воплощения, описанные в данном документе, относятся к "моноклональным" антителам (mAb). Моноклональные антитела получают путем клонирования генов антител в моноклональную клетку-хозяина или соответствующие клеточные линии. Моноклональные антитела могут быть получены любым способом, который продуцирует молекулы антител клеточными линиями в культуре, например культивирование рекомбинантных эукариотических (млекопитающих или насекомых) или прокариотических (бактериальных) клеток-хозяев. Примеры подходящих способов получения моноклональных антител включают гибридные способы Köhler & Milstein (1975, *Nature* 256: 495-497) и способ гибридом с В-клетками человека (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133:3001; и Brodeur et al, 1987, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, (Marcel Dekker, Inc., New York), pp. 51-63).

Антитела, описанные в данном документе, могут быть идентифицированы или получены с применением гибридного способа. В таком способе мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как хомяк, иммунизируют, чтобы извлечь лимфоциты, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфично связываться с белком, используемым для иммунизации. Альтернативно, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с применением подходящего агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, для образования клетки гибридомы.

Культуральную среду, в которой растут клетки гибридомы, анализируют на продуцирование моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно, специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяется иммунопреципитацией или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Моноклональные антитела могут быть затем очищены от надосадочных жидкостей гибридомы для дальнейшего тестирования на их специфическое связывание с антигеном-мишенью и для конструирования антител, например, для различных диагностических или терапевтических целей.

huTNFR1-специфичные антитела, в некоторых случаях, появляются путем скрининга против антигена huTNFR1. Чтобы увеличить вероятность выделения дифференциально связывающихся клонов, следует применять множественное давление отбора путем процессивного скрининга в отношении различных антигенов или эпитопов.

Способы скрининга для идентификации антител с искомыми свойствами селективного связывания могут быть реализованы с помощью дисплейных технологий, использующих библиотеку, презентирующую последовательности антител или их антигенсвязывающие последовательности (например, с применением фагов, бактериальных, дрожжевых клеток или клеток млекопитающих; или дисплейных систем *in vitro*, транслирующих информацию нуклеиновых кислот в соответствующие (поли)пептиды). Реакционную способность можно оценивать на основе ELISA, вестерн-блоттинга или окрашивания поверхности с помощью проточной цитометрии, например используя стандартные анализы.

Выделенный(ые) антиген(ы) можно, например, использовать для отбора антител из библиотеки антител, например, библиотеки антител, презентирруемых фагами, фагемидами или дрожжами.

Конкретные воплощения, описанные в настоящем документе, относятся к "фармацевтическим композициям", такие композиции могут включать антитело, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель, в частности, для получения искусственной, не встречающейся в природе композиции. Эти фармацевтические композиции можно вводить в соответствии с настоящим изобретением в виде болюсной инъекции или инфузии или путем непрерывной инфузии. Фармацевтические носители, подходящие для облегчения таких способов введения, хорошо известны в

данной области.

Фармацевтически приемлемые носители обычно включают любые подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и фунгицидные агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и т.п., которые физиологически совместимы с антителом или связанной композицией, или комбинацией, описанными в данном документе. Дополнительные примеры фармацевтически приемлемых носителей включают стерильную воду, физиологический раствор, физиологический раствор с фосфатным буфером, декстрозу, глицерин, этанол и т.п., а также комбинации любых из них.

В одном таком аспекте антитело может быть объединено с одним или несколькими носителями, подходящими для искомого пути введения, антитела могут быть, например, смешаны с любым из числа лактозы, сахарозы, крахмала, сложных эфиров целлюлозы и алкановых кислот, стеариновой кислоты, талька, стеарата магния, оксида магния, натриевых и кальциевых солей фосфорной и серной кислот, акацииевой камеди, желатина, альгината натрия, поливинилпирролидина, поливинилового спирта и необязательно, дополнительно таблетированы или инкапсулированы для обычного 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. Носитель может включать материал с контролируемым высвобождением или материал с высвобождением с задержкой по времени, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, отдельно или с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области.

Дополнительные фармацевтически приемлемые носители известны в данной области и описаны, например, в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. Жидкие составы могут представлять собой растворы, эмульсии или суспензии и могут включать наполнители, такие как суспендирующие агенты, солюбилизаторы, поверхностно-активные вещества, консерванты и хелатирующие агенты.

Предполагается фармацевтические композиции, в которые включены антитело, описанное в данном документе, и один или несколько терапевтически активных агентов. Стабильные составы антитела, описанные в данном документе, готовят для хранения путем смешивания указанного антитела, имеющего искомую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Составы, используемые для введения *in vivo*, являются стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны или другими способами. Антитело и другие терапевтически активные агенты, раскрытые в данном описании, также могут быть составлены в виде иммунолипосом и/или заключены в микрокапсулы.

Введение фармацевтической композиции, содержащей антитело, описанное в настоящем документе, может осуществляться различными способами, включая перорально, подкожно, внутривенно, интраназально, интраофталмически, трансдермально, через слизистую, местно, например, гели, мази, лосьоны, кремы и т.д., внутривентриально, внутримышечно, внутрилегочно, например, используя ингаляционные технологии или системы доставки в легкие, вагинально, парентерально, ректально или интраокулярно.

Примеры составов, используемых для парентерального введения, включают составы, подходящие для подкожных, внутримышечных или внутривенных инъекций, такие как, например, стерильный раствор, эмульсия или суспензия.

В одном воплощении антитело, описанное в настоящем документе, является единственным терапевтически активным агентом, вводимым объекту, например, как монотерапия, изменяющая или предотвращающая болезнь.

В другом воплощении антитело, описанное в данном документе, комбинируют с другими активными веществами, например, в смеси или наборе частей для лечения объекта, нуждающегося в терапии или профилактике, такой как модифицирующее или предотвращающее заболевание комбинированное лечение.

Комбинация с одним или несколькими другими терапевтическими или профилактическими агентами может включать стандартное лечение, например, антибиотики, стероидные и нестероидные ингибиторы воспаления и/или другую терапию на основе антител. Комбинация может, в частности, включать агенты, которые используются для лечения первичного заболевания, где воспалительные процессы могут привести к вторичным воспалительным, дегенеративным или злокачественным заболеваниям. Основным заболеванием является, например, NASH и комбинация будет, например, включать NSAID или другие новые лекарственные средства, такие как агонисты FXR, агонисты GLP1R или агонисты PPAR.

В комбинированной терапии антитело может вводиться в виде смеси или одновременно с одной или несколькими другими схемами лечения, например или до, одновременно или после сопутствующей терапии.

Биологические свойства антитела или соответствующего фармацевтического препарата, описанного в данном документе, могут быть охарактеризованы *ex vivo* в экспериментах на клетках, тканях и целом организме. Как известно в данной области, лекарства часто тестируют *in vivo* на животных, включая, без ограничения указанных, мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, свиней и обезьян, чтобы измерить эффективность лекарства для лечения заболевания или модели заболевания, или для измерения фармакокине-

тики, фармакодинамики, токсичности и других свойств лекарственного средства. Животных можно называть моделями заболевания. Терапевтические средства часто тестируют на мышах, включая, без ограничения указанных, голых мышей, мышей SCID, мышей с ксенотрансплантатом и трансгенных мышей (включая нокины и нокауты). Такой эксперимент может дать значимые данные для определения потенциала антитела, которое будет использоваться в качестве терапевтического или профилактического средства с соответствующим периодом полувыведения, эффекторной функцией, активностью ингибитора и/или иммунным ответом при пассивной иммунотерапии. Для тестирования может быть использован любой организм, предпочтительно млекопитающие. Например, из-за своего генетического сходства с людьми приматы, обезьяны могут быть подходящими терапевтическими моделями и, таким образом, могут использоваться для проверки эффективности, токсичности, фармакокинетики, фармакодинамики, периода полувыведения или других свойств рассматриваемого агента или композиции. Тесты на людях в конечном счете необходимы для одобрения в качестве лекарственных средств и, поэтому, конечно, такие эксперименты предполагаются. Таким образом, антитело и соответствующие фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть испытаны на людях для определения их терапевтической или профилактической эффективности, токсичности, иммуногенности, фармакокинетики и/или других клинических свойств.

Следовательно, изобретение предусматривает новый способ лечения NASH, и, в частности, те заболевания, которые связаны с NASH. Удивительно, что анти-TNFR1 антитело демонстрировало значительную положительную динамику стеатоза печени и гистологической активности заболевания при NASH, что продемонстрировано на мышинной модели. Ингибирование TNFR1 приводило к значительному снижению процента стеатоза печени, а также содержания триглицеридов. Кроме того, оценка активности NAFLD, которая учитывает стеатоз, баллонирование и лобулярное воспаление, была значительно снижена при лечении анти-TNFR1 антителом. Было неожиданным, что селективное ингибирование TNFR1 демонстрировало положительную динамику фиброза печени на мышинной модели с NAFLD и даже было способно лечить фиброз печени путем уменьшения фиброза в ткани печени. Далее было показано, что обработка анти-TNFR1 антителом способна снижать апоптоз в тканях печени. Кроме того, было достигнуто значительное снижение уровня ALT и сыровоточного инсулина. Таким образом, лечение анти-TNFR1 антителом привело к значительной положительной динамике воспаления и резистентности к инсулину при NAFLD.

Было особенно удивительно, что анти-TNFR1 антитело демонстрировало значительную положительную динамику стеатоза печени и гистологической активности заболеваний при NASH в свете предшествующего уровня техники, поскольку развитие NASH или стеатоза было зарегистрировано как побочный эффект терапии TNFi. Feagins et al. сообщили, что у пациентов с болезнью Крона, ревматоидным артритом, псориатическим артритом и анкилозирующим спондилитом, которых лечили инфликсимабом, адалимумабом или этанерцептом, развились аномальные уровни ALT во время лечения TNFi, и они показали NAFLD (NASH или стеатоз) при биопсии печени (Eur J Gastroenterol Hepat. 2015, 27(10): 1154-1160). Таким образом, было совершенно неожиданно, что селективное ингибирование TNFR1 эффективно против NASH.

Примерами антител, описанных в данном документе, являются, например, полноразмерные антитела, полученные в соответствии с WO2012035141, и/или их родительское мышинное антитело H398, описанное в WO2008113515A2, функционально активные варианты с аффинно-зрелыми вариантами и/или фрагменты антител любого из вышеупомянутых или те антитела, которые являются моновалентными связывающими анти-huTNFR1 и содержат антигенсвязывающий сайт любого из вышеуказанных, таких как моновалентные антитела, описанные в WO2017174586 A1.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, без ограничения ими.

Примеры

Пример 1: Положительная динамика стеатоза печени и гистологической активности заболевания у мышей с экспериментальной NAFLD.

Методы:

B6-huTNFR1-k/i-мыши получали диету с высоким содержанием жира (HFD), состоящую из 60% ккал жира + фруктоза/сахароза в питьевой воде (Kohli R et al, Hepatology 2010) в течение 24 недель, дополненную либо анти-TNFR1 (атросаб), либо контрольным антителом (цетуксимаб, анти-EGFR антитело, Erbitux®, ImClone Systems, Bristol-Myers Squibb und Merck KGaA) (20 мг/кг массы тела, 2x/w) в течение последующих 8 недель.

Антитело атросаб, используемое в настоящем документе, представляет собой полноразмерное антитело, полученное в соответствии с WO2012035141, и содержит антигенсвязывающий сайт, включенный в комбинацию домена VH и VL, содержащее шесть последовательностей CDR, которые представляют собой:

SEQ ID NO: 23: VH-CDR1;

SEQ ID NO: 24: VH-CDR2;

SEQ ID NO: 25: VH-CDR3;

SEQ ID NO: 26: VL-CDR1;

SEQ ID NO: 27: VL-CDR2;

SEQ ID NO: 28: VL-CDR3.

В конце обработки ткани печени у мышей с дифференцированным лечением сравнивали на предмет стеатоза печени, показателя активности NAFLD, апоптоза и фиброза.

Процент стеатоза, а также показатель активности NAFLD (NAS) по Kleiner et al. (Hepatology 2005) оценивал патолог. Содержание триглицеридов определяли в гомогенизированных тканях печени с помощью ферментного теста (Roche Diagnostics). Апоптоз исследовали иммуногистохимией с применением антитела для активированной каспазы-3 (Cell Signaling). Фиброз определяли окрашиванием Sirius Red в соответствии с протоколом производителя (Sigma Aldrich) и количественно определяли, как описано (Schindelin J et al., Nat Methods 2012).

Сыворотки были проанализированы на уровни ALT с помощью кинетического УФ-теста (Beckman Coulter), а уровни инсулина были измерены с применением набора ELISA для сверхчувствительного мышиногено инсулина (Crystal Chem.) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты:

Обработка атросабом привела к значительной положительной динамике стеатоза печени и гистологической активности заболевания у мышей с экспериментальной NAFLD.

Ткани печени мышей HFD, получавших анти-TNFR1 антитело (атросаб) или контрольное антитело (цетуксимаб), гистологически анализировали на процент стеатоза печени, содержания триглицеридов и активности заболевания, оцениваемых по шкале активности NAFLD (NAS). По сравнению с мышами, получавшими контрольное антитело, ингибирование TNFR1 приводило к значительному снижению процента стеатоза печени ($p < 0,05$; Фиг. 1A), а также содержания триглицеридов ($p < 0,01$; Фиг. 1B). Кроме того, показатель активности NAFLD (NAS), который учитывает стеатоз, баллонирование и лобулярное воспаление, значительно ($p < 0,05$) снизился у обработанных Атросабом по сравнению с контрольными мышами (Фиг. 1C).

Пример 2. Селективное ингибирование TNFR1 связано с положительной динамикой фиброза печени на мышинной модели с NAFLD.

Продemonстрировав, что селективное ингибирование TNFR1 демонстрирует положительную динамику стеатоза печени и NAS, проанализировали влияние атросабом на редуцирование фиброза. Положительная динамика фиброза печени была продемонстрирована при оценке окрашиванием Сириусом красным у мышей, получавших анти-TNFR1-антитело, по сравнению с мышами, получавшими контрольное антитело (Фиг. 2A). Количественное определение фиброзной области выявило значительное ($p < 0,05$) снижение фиброза в тканях печени у мышей, получавших анти-TNFR1-антитело, по сравнению с контрольными мышами (Фиг. 2B).

Пример 3. Пониженный апоптоз в тканях печени мышей с NAFLD, обработанных анти-TNFR1 антителом.

В начальных экспериментах мыши получали HFD в течение 20 недель, включая 4-недельную обработку анти-TNFR1 антителом или контрольным антителом. Было продемонстрировано, что обработка анти-TNFR1 антителом способна снижать апоптоз, что оценивалось иммуногистохимическим анализом активной каспазы-3 уже в течение 4-недельного периода обработки. По сравнению с контрольным антителом, значительное ($p < 0,05$) снижение активной каспазы-3 может наблюдаться в тканях печени мышей, получавших анти-TNFR1 антитело (Фиг. 3).

Пример 4. Положительная динамика уровней ALT и инсулина в сыворотке мышей с NAFLD, обработанных анти-TNFR1 антителом.

Наряду с наблюдением положительной динамики гистологии у мышей, получавших анти-TNFR1-антитело (Фиг. 1 и 2), было продемонстрировано значительное ($p < 0,05$) снижение уровней ALT (Фиг. 4A) и инсулина (Фиг. 4B) в сыворотке мышей обработанные анти-TNFR1 антителом, по сравнению с обработанными контрольным антителом. Таким образом, селективное анти-TNFR1 ингибирование приводило к значительной положительной динамике воспаления и инсулинорезистентности.

Пример 5: Описание атросимаба - получение и характеристика.

Материалы.

Антитело атросаб получали, как описано в Примере 1. Рекомбинантный гибридный белок TNFR1-Fc человека получали, как описано в WO2012035141. Атросимаб (HC: SEQ ID NO: 18; LC: SEQ ID NO: 13) получали и очищали после лентивирусной трансдукции в клетках CHO с помощью Catalent (Catalent Pharma Solutions, Сомерсет, Юинг, Нью-Джерси, США). Анти-His-HRP (His-6 His-Probe-HRP, sc-8036) приобретали у Santa Cruz Biotechnology (Санта-Круз, Калифорния, США). Антитело против IgG A человека (козьи, поликлональные, 2010-01) приобретали у SouthernBiotech, а антитело против IgG B человека (козьи, поликлональные, MBS571163), а также антитело против IgG B человека (козьи, поликлональные, MBS571678) - у MyBioSource (Сан-Диего, Калифорния, США). Кроме того, антитело против IgG человека (Fab-специфичное, A 0293) и антитело против IgG человека (Fc-специфичное, A 0170) приобретали у Sigma-Aldrich (Тауфкирхен, Германия).

Получение белков.

Референсный белок Fab 13.7 получали, как описано в WO2017174586 A1, в транзитивно трансфицированных клетках HEK 293E с применением полиэтиленимина (линейный, 25 кДа, Sigma-Aldrich, Тауфкирхен, Германия) и очищали с помощью аффинной хроматографии белка строго в соответствии с рекомендациями производителя (CaptureSelect™ IgG- CH1 Affinity Matrix, 194320005, Thermo Fisher Scientific, Драйайх, Германия).

Характеризация белка.

Чистоту и правильную сборку атросимаба анализировали с помощью SDS-PAGE с применением 4 мкг очищенного белка в присутствии и в отсутствие бета-меркаптоэтанола в качестве восстановителя. Белки в геле окрашивали с применением кумасси-бриллиантового синего, и удаляли краситель из гелей водой. Интактный белок анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии с применением ВЭЖХ Waters 2695 и колонки Phenomenex Yarra SEC-2000 (300×7,8 мм). Стандартные белки: тиреоглобулин (669 кДа), апоферритин (443 кДа), алкогольдегидрогеназа (150 кДа), BSA (66 кДа), карбоновая ангидраза (29 кДа), пептид FLAG (1 кДа).

Термическая стабильность.

Температуру плавления/агрегации (T_m) атросимаба определяли динамическим рассеянием света (ZetaSizer Nano ZS, Malvern, Herrenberg, Germany) с применением 100 мкг очищенного белка в PBS. Применяемую температуру увеличивали с интервалом 1°C с 35 до 80°C со временем уравнивания 2 минуты перед каждым измерением. T_m определяли путем визуальной интерпретации возрастающего сигнала (килоимпульсов в секунду).

Стабильность в плазме.

Образцы очищенного атросимаба разводили в плазме человека до концентрации 100 нМ и инкубировали при 37°C в течение 1, 3 и 7 дней. Последующий анализ остаточной способности связывания с человеческим TNFR1 проводили с помощью ELISA после серийного разведения в 2% обезжиренном молоке в PBS (2% MPBS) с шагами от 1 до 3,16 (квадратный корень из 10). Контрольные образцы инкубировали при 4°C в PBS в течение 7 дней или непосредственно замораживали после разведения в плазме человека.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Планшеты для микротитрования покрывали 100 мкл гибридного белка TNFR1-Fc (1 мкг/мл в PBS) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Остаточные сайты связывания блокировали 2% MPBS (обезжиренное молоко в PBS, 200 мкл на лунку) при комнатной температуре в течение 2 часов и затем дважды промывали PBS. 100 мкл образцов, разведенных в 2% MPBS, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа перед последней стадией инкубации со 100 мкл антител, конъюгированных с HRP, в 2% MPBS. Связанный белок определяли с помощью 100 мкл раствора субстрата TMB (1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина [TMB], 0,006% H_2O_2 в 100 мМ Na-ацетатном буфере, pH 6 при комнатной температуре), HRP-реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М H_2SO_4 и поглощение при длине волны 450 нм измеряли с применением устройства для считывания планшетов для микротитрования Infinite (TECAN, Меннедорф, Швейцария). Между каждой стадией инкубации и перед детекцией планшеты дважды промывали PBST и дважды PBS.

Измерения аффинности с применением пьезоэлектрического микровзвешивания.

Динамика связывания в реальном времени в межбелковых взаимодействиях определялась с помощью измерений пьезоэлектрического микровзвешивания (Cell-200 C-Fast, Attana, Стокгольм, Швеция). Один из партнеров по связыванию (TNFR1-Fc) химически иммобилизовали на чипе LNB Carboxyl Sensor (3623-3103, Attana, Стокгольм, Швеция) в соответствии с протоколом производителя при умеренной плотности ~ 94 АГц. Эксперименты по связыванию проводили с образцами (анализируемым веществом), разведенными в PBST (PBS, 0,1% Твин 20) в интервале от 128 нМ до 4 нМ (стадии разведения 1:2) при pH 7,4 со скоростью потока 25 мкл/мин при 37°C. Чип регенерировали с помощью 25 мкл 20 мМ глицина, pH 2,0. Каждое третье измерение измеряли инъекцию рабочего буфера, которую вычитали из кривой связывания перед анализом данных. Данные собирали с применением программного обеспечения, предоставленного Attana, и анализировали с помощью программного обеспечения Attache Office Evaluation (Attana, Стокгольм, Швеция) и TraceDrawe (ridgview instruments, Vange, Швеция).

Анализ высвобождения 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 надосадочные жидкости заменяли для удаления конститутивно продуцируемых цитокинов. Клетки инкубировали с сериями разведений образцов в RPMI 1640 + 5% FCS при 37°C, 5% CO_2 . В случае конкурентных экспериментов оба образца анализируемого белка готовили по отдельности (либо титровали, либо разбавляли до одной концентрации), а затем добавляли в планшет. Нестимулированные клетки служили контролем. Через 16-20 часов планшеты центрифугировали при 500 g в течение 5 минут и клеточные надосадочные жидкости анализировали непосредственно методом ELISA, который проводили в соответствии с протоколом производителя. Надосадочные жидкости разводили в RPMI 1640 (без FCS), а антитела разводили в разбавителе для реагентов (0,1% BSA, 0,05% Tween 20, 20 мМ TRIS, 150 мМ NaCl, pH 7,5). Микротитрационные планшеты с покрытием блокировали, используя 1% BSA

(бычий сывороточный альбумин) в PBS, и промывали, а также обнаружение и измерение проводили, как описано выше для ELISA. Наборы для сэндвич-ELISA для определения IL-6 и IL-8 в надосадочной жидкости клеточной культуры приобретали у ImmunoTools (Friesoythe, Германия).

Цитотоксичность/анализ жизнеспособности клеток.

Клетки (1×10^4 на лунку) высевали в 96-луночные планшеты для микротитрования и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. Белки разбавляли RPMI 1640 + 10% FCS и добавляли к клеткам. При анализе цитотоксичности проводили инкубацию при 37°C, 5% CO₂ в течение 24 часов, затем отбрасывали надосадочную жидкость и в лунки добавляли 50 мкл раствора кристаллического фиолетового. Затем планшеты промывали в ddH₂O в течение 20 раз и сушили. Оставшийся фиолетовый краситель, полученный из живых и адгерентных клеток, которые были зафиксированы метанолом, содержащимся в окрашивающем растворе, растворяли путем добавления 100 мкл метанола при встряхивании при комнатной температуре в течение 10 минут. Планшеты измеряли с применением устройства для считывания микропланшетов Infinite (Tecan, Maennedorf, Switzerland).

Фармакокинетика.

Трансгенные мыши C57BL/6J, несущие ген внеклеточного домена человеческого TNFR-1 в локусе конкретного гена мыши (C57BL/6J-huTNFRSF1Aecdtm1UEG/izi, Dong et al., 2016), получали внутривенную инъекцию 400 мкг атросимаба. Образцы крови собирали через 3 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч и 6 ч, а также через 3 и 7 дней и немедленно инкубировали на льду. Сыворотку отделяли центрифугированием (13000 г, 4°C, 10 минут) и хранили при -20°C. Оставшийся белок в сыворотке крови определяли путем связывания ELISA, как описано выше. Сигнал ELISA интерполировали по свежеприготовленной стандартной кривой связывания анализируемого белка. Определенные концентрации наносили на график в зависимости от времени, и фармакокинетические константы получали при анализе с применением надстройки PKsolver для Microsoft Excel.

Пример 5.1: Биохимическая характеристика Атросимаба.

Моновалентный антагонист, специфичный к рецептору-1 (TNFR1) фактора некроза опухоли, обозначенный как атросимаб, получали путем слияния вариабельных доменов Fab 13.7 с N-концом гетеродимеризующего Fc-модуля Fc μ k (one/kappa). Этот процесс привел к получению Fab-подобной одновалентной молекулы увеличенного размера, обладающей способностью взаимодействовать с неонатальным Fc-рецептором для обеспечения увеличенной циркуляции в сыворотке (Фиг. 6а). Полученный кандидат лекарственного средства атросимаб получали в клетках CHO после нескольких циклов лентивирусной трансдукции, очищали аффинной хроматографией с протеином А и последовательной эксклюзионной хроматографией (SEC) с помощью Catalent Pharma Solutions (Catalent Pharma Solutions, Коммерсет, Юинг, Нью-Джерси, США).

Атросимаб продемонстрировал единственный пик в SEC при времени удерживания 17,9 минут с интерполированной молекулярной массой 81 кДа и радиусом Стокса rS 3,5 нм (Фиг. 6б). В SDS-PAGE в восстанавливающих условиях были обнаружены две полосы 38 кДа и 43 кДа, а также одна полоса 70 кДа в невосстанавливающих условиях (Фиг. 6с). Эти данные хорошо соответствуют расчетной молекулярной массе 72 кДа (состоящей из цепей 35 кДа и 36 кДа), и указывают на правильную экспрессию обеих полипептидных цепей и правильную сборку функционального гетеродимерного белка. Кроме того, атросимаб продемонстрировал точку агрегации (Tm), равную 64°C, которую определили динамическим рассеянием света (DLS, Фиг. 6д), что сопоставимо с таковым у интактных молекул IgG, проанализированных также с помощью DLS (Martin et al., 2014, Brader et al., 2015)). Наконец, связывающая активность атросимаба с человеческим TNFR1-Fc оставалась неизменной после инкубации в плазме человека в течение вплоть до 7 дней, что указывает на хорошую стабильность в плазме (Фиг. 6е).

Пример 5.2: связывание атросимаба с TNFR1, рецепторами Fc γ и белком комплемента C1q.

Взаимодействие атросимаба с его рецептором-мишенью TNFR1 анализировали с помощью ELISA в условиях равновесия, в результате чего значение EC₅₀ составляло 0,4 нМ (Фиг. 7а), что представляет двукратное снижение активности связывания по сравнению с родительским Fab 13.7 и четырехкратное снижение по сравнению с двухвалентным IgG ATROSAB. Кроме того, атросимаб связывался в исследовании связывания в реальном времени с применением пьезоэлектрического микровзвешивания с человеческим TNFR1, иммобилизованным при умеренной плотности рецепторов ~ 94 ΔГц, с кажущимся значением KD 2,7 нМ и kon $3,7 \times 10^5$ M⁻¹ s⁻¹ и koff $9,8 \times 10^{-4}$ s⁻¹ (Фиг. 7б), что было проанализировано с помощью алгоритма связывания 1:1. Следует отметить, что атросимаб включает Fc-область, которая модифицирована для снижения опосредованных антителами эффекторных функций (Armor et al, 1999). Соответственно, атросимаб продемонстрировал почти полное отсутствие связывания с человеческими рецепторами Fc γ Ia, IIb и IIIa, а также с белком комплемента C1q, что продемонстрировано с помощью ELISA (Фиг. 7с). Связывание было снижено до такой же степени (Fc γ RI и Fc γ RIII) или даже более выражено (Fc γ RIIb и C1q) по сравнению с ранее описанным анти-TNFR1 человека IgG ATROSAB (Zettlitz et al., 2010), который несет идентичные модификации Fc в отношении к Fc γ -рецептору и C1q-связывания.

Пример 5.3: Атросимаб ингибирует активацию TNFR1 in vitro и не обладает какой-либо агонистической активностью.

Атросимаб продемонстрировал полное отсутствие какой-либо агонистической биоактивности в пределах анализируемого диапазона концентраций между 50 пМ и 500 нМ в экспериментах по высвобождению интерлейкина (IL) с применением клеток HeLa для анализа на IL-6 и клеток HT1080 на IL-8, а также в анализах индукции гибели клеток с применением клеток Кум-1 (Фиг. 3а-с). Идентичная утрата агонистической активности была обнаружена в случае родительского Fab 13.7. Напротив, двухвалентный IgG ATROSAB индуцировал предельное высвобождение IL-6 и IL-8 в концентрациях от 1 нМ до 100 нМ (Фиг. 8а и б), что подтверждает ранее опубликованные данные (Richter et al., 2013). Напротив, предельная агонистическая активность ATROSAB не может быть обнаружена в анализе индукции гибели клеток Кум-1 (Фиг. 8с).

Кроме того, атросимаб ингибировал активацию TNFR1, индуцированную 0,1 нМ TNF, в анализе высвобождения IL-6 из HeLa и в анализе высвобождения IL-8 из HT1080 со значениями EC₅₀ 54,5 нМ и 24,2 нМ, соответственно (Фиг. 8д и е). Более того, гибель клеток, индуцированная 0,1 нМ TNF в клетках Кум-1, ингибировалась атросимабом со значением IC₅₀ 16,2 нМ (Фиг. 8ф). По сравнению с родительским Fab 13.7 эти данные представляют снижение биологической активности в 1,5-1,9 раза (Табл. 1). Однако по сравнению с биоактивностью двухвалентного IgG ATROSAB атросимаб продемонстрировал в 3,0 раза, в 3,5 раза и 4,0 раза более сильное ингибирование TNF-опосредованной активации TNFR1, что определено в анализе высвобождения IL6, анализе высвобождения IL-8 и анализе индукции гибели клеток, соответственно (табл. 1).

Таблица 1
Биоактивность атросимаба1

	Атросимаб	Fab 13.7	ATROSAB
IC ₅₀ , IL-6 [нМ]	54,5	37,1	164,7
IC ₅₀ , IL-8 [нМ]	24,2	12,7	84,1
IC ₅₀ , индукция гибели клеток [нМ]	16,2	9,5	64,4

С целью устранения потенциального риска вторичного сшивания атросимаба, опосредованного, например, антителами против лекарственного средства (ADA), агонистический потенциал атросимаба анализировали в присутствии трех различных мышиных сывороток против человеческого IgG в анализах высвобождения IL-8 с применением клеток HT1080 (Richter et al. 2013). ELISA продемонстрировала связывание мышиных сывороток против IgG человека с атросимабом, Fab 13.7 и ATROSAB (данные не представлены). Примечательно, что атросимаб не вызывал какого-либо высвобождения IL-8 в пределах анализируемого диапазона концентраций (от 50 пМ до 500 нМ), что также наблюдалось для родительского Fab 13.7 (Фиг. 9а-с). Напротив, двухвалентный IgG ATROSAB индуцировал явно повышенное высвобождение IL-8 (Фиг. 9а-с) по сравнению с предельным высвобождением, наблюдаемым на Фиг. 8, что указывает на явно сниженную склонность Атросимаба опосредовать любую активацию TNFR1 даже при наличии антител, специфических к лекарственному средству, по сравнению с ATROSAB.

Пример 5.4: Фармакокинетика атросимаба.

Наконец, фармакокинетические свойства атросимаба регистрировали после болюсной инъекции 400 мкг белка с использованием мышей C57BL/6J-huTNFRSF1Aecdtm1UEG/izi (Dong et al., 2016), которые несут трансген внеклеточного домена человеческого TNFR1 (Фиг. 10, табл. 2). Атросимаб удалялся из кровообращения у мышей с начальным периодом полувыведения $2,2 \pm 1,2$ часа и конечным периодом полувыведения $41,8 \pm 18,1$ часа, что привело к площади под кривой $5856,0 \pm 1369,9$ мкг/мл × ч.

Таблица 2
Фармакокинетический анализ атросимаба2

t _{1/2α} (ч)	2,2	=	1,2
t _{1/2β} (ч)	41,8	=	18,1
C ₀ (мкг/мл)	324,7	=	53,5
AUC 0-t (мкг/мл × ч)	5856,	=	1369,9
V _{ss} (мкг/(мкг/мл))	3,4	=	1,3
CL ((мкг)/(мкг/мл)/ч)	0.29	=	0.20

t_{1/2α}, начальный период полувыведения; t_{1/2β}, конечный период полувыведения; C₀, интерполированная начальная концентрация; AUC 0-t, площадь под кривой до момента обнаружения лазером временной точки; V_{ss}, объем распределения (в устойчивом состоянии); CL, клиренс.

Список литературы

- Armour KL, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM. Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol*. 1999 Aug;29(8):2613-24.
- Brader ML, Estey T, Bai S, Alston RW, Lucas KK, Lantz S, Landsman P, Maloney KM. Examination of thermal unfolding and aggregation profiles of a series of developable therapeutic monoclonal antibodies. *Mol Pharm*. 2015 Apr 6;12(4):1005-17. doi: 10.1021/mp400666b.
- Dong Y, Fischer R, Naudé PJ, Maier O, Nyakas C, Duffey M, Van der Zee EA, Dekens D, Douwenga W, Herrmann A, Guenzi E, Kontermann RE, Pfizenmaier K, Eisel UL. Essential protective role of tumor necrosis factor receptor 2 in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:12304-9; PMID:27791020; <https://doi.org/10.1073/pnas.1605195113>
- Martin N, Ma D, Herbet A, Boquet D, Winnik FM, Tribet C. Prevention of thermally induced aggregation of IgG antibodies by noncovalent interaction with poly(acrylate) derivatives. *Biomacromolecules*. 2014 Aug 11;15(8):2952-62. doi: 10.1021/bm5005756.
- Zettlitz KA, Lorenz V, Landauer K, Munkel S, Herrmann A, Scheurich P, Pfizenmaier K, Kontermann R. ATROSAB, a humanized antagonistic anti-tumor necrosis factor receptor one-specific antibody. *MAbs*. 2010 Nov-Dec;2(6):639-47. Epub 2010 Nov 1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антитела, специфически распознающего человеческий рецептор-1 фактора некроза опухоли (huTNFR1), при лечении неалкогольного стеатогепатита (NASH) и фиброза печени.
2. Применение по п.1, где антитело специфически распознает эпитоп в мембранно-дистальном CRD1 и/или субдомене A1 CRD2 в huTNFR1, предпочтительно специфически распознавая эпитоп, представленный аминокислотами 1-115 в N-концевой области huTNFR1.
3. Применение по п.1 или 2, где антитело представляет собой моноклональное антитело.
4. Применение по любому из пп.1-3, где антитело представляет собой моноспецифическое, двухвалентное полноразмерное антитело.
5. Применение по п.4, где антитело включает Fc-домен IgG1, который является недостаточным для обеспечения эффекторной функции, предпочтительно включающий по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из E233P, L234V, L235A, AG236, A327G, A330S и P331S, предпочтительно включает A327G/A330S/P331S, причем нумерация соответствует индексу EU по Kabat.
6. Применение по любому из пп.1-3, где антитело моновалентно распознает huTNFR1.
7. Применение по любому из пп.1-6, где антитело включает
 - a) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), включающий определяющие комплементарность области (CDR): VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3; и
 - b) вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий CDR: VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, где
 - i) VH-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 1; VH-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 2, VH-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 3, VL-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 4, VL-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 5, VL-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 6; или
 - ii) VH-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 23, VH-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 24, VH-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 25, VL-CDR1 включает или состоит из SEQ ID NO: 26, VL-CDR2 включает или состоит из SEQ ID NO: 27, VL-CDR3 включает или состоит из SEQ ID NO: 28, где нумерация соответствует индексу EU по Kabat; или функционально активный вариант любого из i) или ii), как указано выше, который включает 0, 1 или 2 точечные мутации в каждой из последовательностей CDR и который специфически распознает huTNFR1.
8. Применение по любому из пп.1-7, где антитело включает последовательность VH, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 7 или 9; и последовательность VL, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 8 или 10, или их функционально активный вариант, включающий до 1 точечной мутации в каждой из последовательностей CDR, и с по меньшей мере 60% идентичностью последовательностей в карманных (FR) последовательностях FR1-4 из VH и VL.
9. Применение по любому из пп.1-8, где антитело используют в эффективном количестве для противодействия передаче сигналов TNFα/huTNFR1.

10. Применение по любому из пп.1-9, где лечение NASH и фиброза печени включает уменьшение любого одного или нескольких из

а) стеатоза, содержания триглицеридов, воспаления и/или апоптоза в ткани печени;

б) уровня аминотрансферазы в сыворотке;

в) инсулинорезистентности и необязательно положительной динамики толерантности к глюкозе; и/или

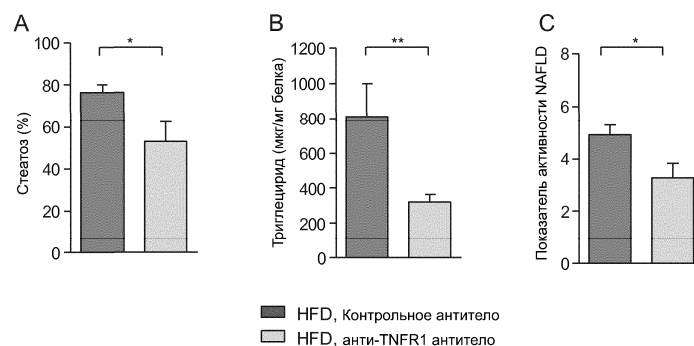
д) балла активности NAFLD.

11. Применение по любому из пп.1-10, где антитело используют в дозе от 0,05 до 20 мг/кг.

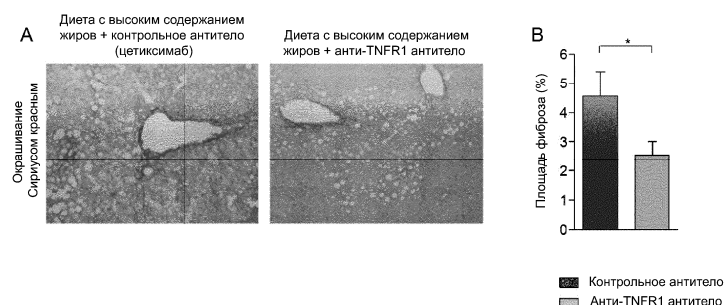
12. Применение по любому из пп.1-11, где антитело используют в сочетании с противовоспалительными лекарственными средствами, агонистом фарнезоидного X-рецептора (FXR), агонистом рецептора глюкагон-подобного пептида-1 (GLP1R) или агонистом рецептора, активируемого пролифератором пероксисомы (PPAR).

13. Применение по любому из пп.1-12, где антитело применяют для лечения NASH у пациента, который имеет NASH, а также страдает сахарным диабетом типа II, сахарным диабетом типа I, преддиабетом, инсулинорезистентностью или ожирением, где ожирение определяется у пациента, имеющего индекс массы тела по меньшей мере 30.

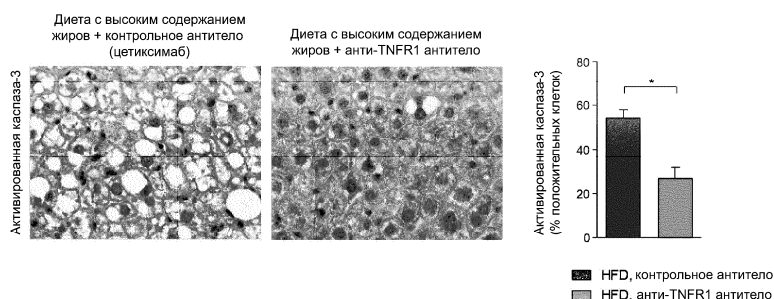
14. Применение по любому из пп.1-13, где антитело представлено в виде фармацевтического состава, включающего эффективное количество этого антитела.



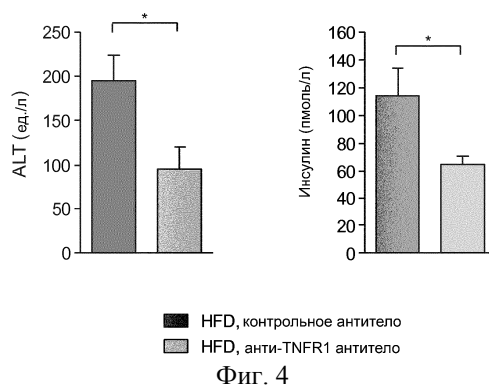
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



SEQ ID NO: 1:VH-CDR1
DFYIN

SEQ ID NO: 2: VH-CDR2
EIXPXXGXAXYNXKFKA,
где

X в положении 3 представляет собой любое из Y или V;
X в положении 5 представляет собой любое из Y, T, S или G;
X в положении 6 представляет собой любое из S или Q;
X в положении 8 представляет собой любое из H или E;
X в положении 10 представляет собой любое из Y или K;
X в положении 13 представляет собой любое из E или D

SEQ ID NO:3: VH-CDR3
WDFLDY

SEQ ID NO:4: VL-CDR1
RSSQSLLHSNGNTYLH

SEQ ID NO:5: VL-CDR2
TVSNRFS

SEQ ID NO:6: VL-CDR3
SQXTHVPYT
где X в положении 3 представляет собой любое из S или G

SEQ ID NO:7: VH из IgG13.7/ Fab13.7
HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQG
EAKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARWDFLDYWGGGTTVTV
SS

SEQ ID NO:8: VL из IgG13.7/ Fab13.7
DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLHSNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTVS
NRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIKRTV
AA

SEQ ID NO:9: VH из ATROSAB/ IZI06.1
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPYSG
HAYYNEKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARWDFLDYWGGGTTVTV
SS

Фиг. 5

SEQ ID NO:10: VL из ATROSAB/ IZI06.1
 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSHNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSN
 RFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCSQSTHVPYTFGGGTKEIKR

SEQ ID NO: 11: (Fab13.7, тяжелая цепь [полужирный шрифт = VH])
HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFDIFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQG
EAKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGT**TVT**
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

SEQ ID NO: 12: (Fab13.7, легкая цепь [полужирный шрифт = VL])
DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLSHNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTV
SNRFGSVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 13: VL1C (VL13.7-CH2-CH31; цепь, содержащая VL и CH1):
DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLSHNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTV
SNRFGSVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKEIKG
TGGGSGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFSPDI AVEWESGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYSCSV MHEALHNHYTQKSVEPKSC

VL1C подробно:

SEQ ID NO:14: VL13.7
 DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLSHNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTVS
 NRFGSVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKEIK

SEQ ID NO:15: Линкер
 GTGGGSG

SEQ ID NO:16: CH2
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

SEQ ID NO:17: CH31
 GQPREPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFSPDI AVEWESGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYSCSV MHEALHNHYTQKSVEPKSC

SEQ ID NO:18: VHκC (VH13.7-CH2-CH3-каппа; цепь, содержащая VH и CLκ):
HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFDIFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQG
EAKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGT**TVT**
VSSGTGGGSGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
KGQPREPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLVNNFYPRI AVEWEVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYSCSV MHEALHNHYTQKSFNREGC

Фиг. 5 (Продолжение)

VHkC подробно:

SEQ ID NO:19: VH13.7
HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQG
EAKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTV
SS

SEQ ID NO:15: Линкер
GTGGGSG

SEQ ID NO:16: CH2
PSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAK

SEQ ID NO:20: CH3k
GQPREPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLVNNFYPRDIAVEWEVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYSCSVMHEALHNHYTQKSFNREGC

SEQ ID NO: 21: VL1C (VL13.7-CH2-CH31: цепь, содержащая VL и CH1):

gatgtgcagatgaccagagccccagcagcctgtctgccagcgtgggcgacagagtgaccatcacctgtcggagcag
ccagagcctgtctgcacagcaacggcaacacctactgtcattggtatcagcagaagcccggaaggccccaagctg
ctgatctacaccggtgtccaacagattcagcggcggtgccctctagatctccggctctgagcagcggcaccgacttcacctg
accatctctagcctgcagccgagcggacttcgccactactcagcagctaccaccaagctgtccgtatcaccttggcg
aggaccacaaggtggaaatcaaaaggtaccggcggaagcttggccctagcgtgttcctgttccccc aaagcccaagg
acacctgatgatctcccggacccccgaagtgcactctgctggtggtggtggtgtgtccacgaggacctgaagtgaagttt
aattggtacgtggacggcggtggaagtgcataacgcaagcaagcggcagaggaaacagtaacaacagcacctac
cggtgtggtgttcctgtgcactgtgcacaggactgttgcaaggcgaagagtgacaagtgcaaggtgttccaa
gggctgtccgacagctcgtgagaaacatcagcaaggcccaaggccagcctcggggaacctcgggtgttctcttg
ccctagcagcaagagcacctctggcggaacagccgccttgggtgctctgtgaaggactcttcccagcgacattg
ccgtggaatgggagctctggccctgcaccgcgagctgtacatccttccagcagtgctccagagcagcggcgttaca
gcttagagcagcgtctgtgacagtgcccagctctagccttgggcacccagacctcttgcagcgtgatgcagaggccct
gcacaacacctacaccagaaagcgtggaacccaagagctgc

SEQ ID NO: 22: VHκC (VH13.7-CH2-CH3-каппа: цепь, содержащая VH и CLκ):

[illegible]

Фиг. 5 (Продолжение)

SEQ ID NO:23
DFYIN

SEQ ID NO:24
EIYPYSGHAYYNEKFA

SEQ ID NO:25
WDFLDY

SEQ ID NO:26
RSSQSLLHSNGNTYLH

SEQ ID NO:27
TVSNRFS

SEQ ID NO:28
SQSTHVPYT

SEQ ID NO:29:
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIYPYSG
HAYYNEKFARVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTV
SS

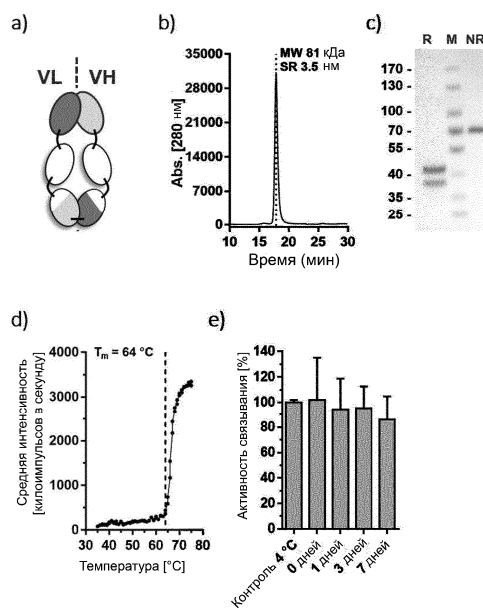
SEQ ID NO:30:
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSN
RFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKEIKR

SEQ ID NO: 31: Fc из IgG1 человека:
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

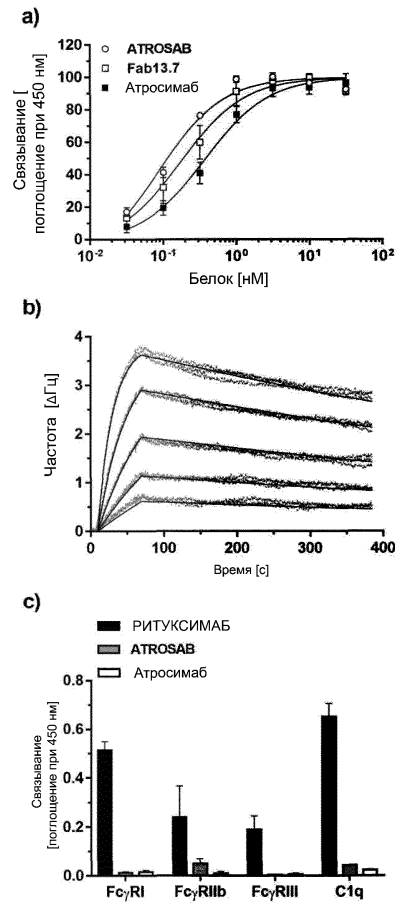
SEQ ID NO: 32: последовательность huTNFRI:
MGLSTVPDLLPLVLELLVGIYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICC
TKCHKGTLYNDPCPGQDQDCRECEGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEIS
SCTVDRDTCVGCGRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHA
GFFLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGTTVLLPLVIFFGCLLSLLFI
GLMYRYQRWWSKLYSIVCGKSTPEKEGELEGTITKPLAPNPSFSPTPGFTPTLGFSP
VPSSTFTSSSTYTPGDCPNFAAPRREVAPPYQGADPILATALASDPINPLQKWEDSA
HKPQSLDTPATLYAVVENVPPLRWKEFVRRRLGLSDHEIDRLQLQNGRCLREAQYS
MLATWRRRTPRREATLELLGRVLRDMDLLGCLEDIEEALCGPAALPPAPSLLR

SEQ ID NO: 33: шарнирная область IgG1:
DKTHTCPPCPAPELLGG

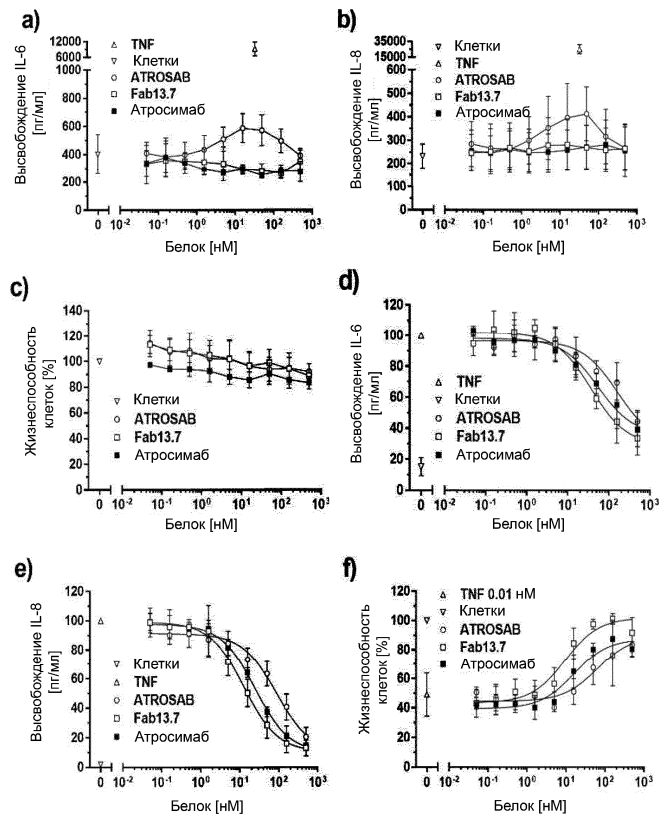
Фиг. 5 (Продолжение)



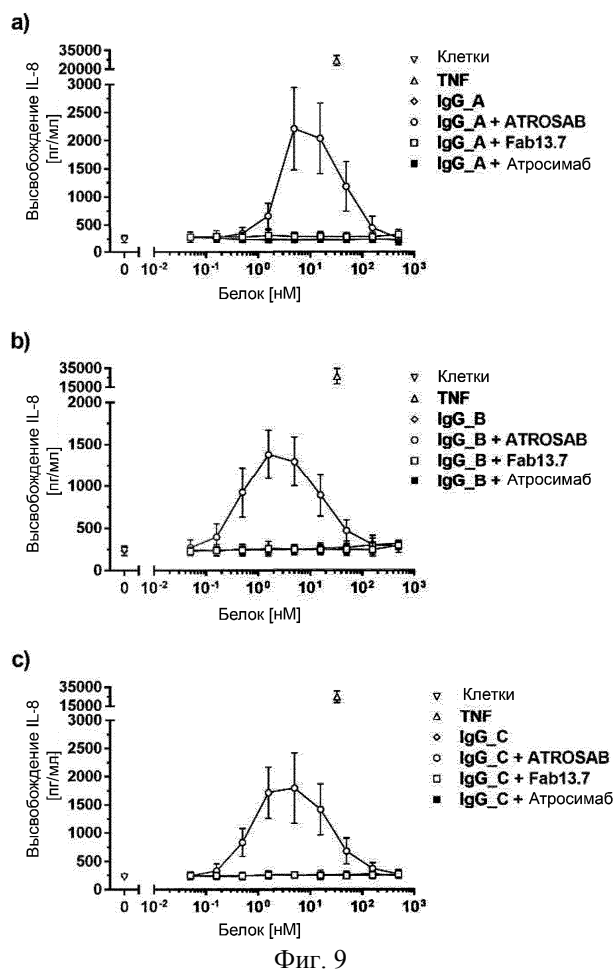
Фиг. 6



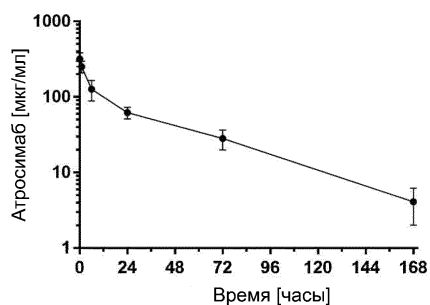
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

