

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293051 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.02

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.11

(54) АНТИТЕЛА-АНТАГОНИСТЫ ПРОТИВ GLP1R И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/023,307

(32) 2020.05.12

(33) US

(86) PCT/US2021/031694

(87) WO 2021/231366 2021.11.18

(71) Заявитель:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

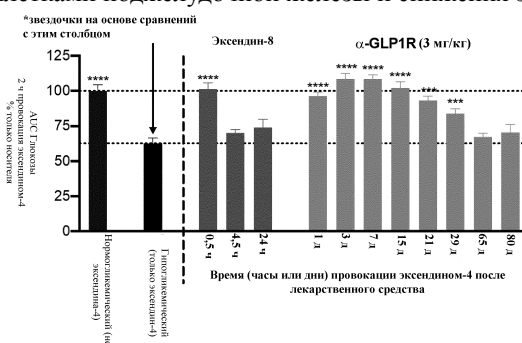
(72) Изобретатель:

Окамото Харука, Ким Джи Х. (US)

(74) Представитель:

Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (RU)

(57) Изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с белком рецептора глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1R), и к способам их применения. В различных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой полностью человеческие антитела, которые связываются с GLP1R. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для ослабления активности GLP1R, таким образом обеспечивая средства лечения, предупреждения или ослабления связанного с GLP1R заболевания, нарушения или состояния у людей. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты повышают уровень глюкозы при введении субъекту и тем самым лечат гипогликемию, такую как постбариатрическая гипогликемия (РВН), путем ослабления секреции инсулина бета-клетками поджелудочной железы и снижения экспрессии инсулина.



A1

202293051

202293051

A1

АНТИТЕЛА-АНТАГОНИСТЫ ПРОТИВ GLP1R И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антителам-антагонистам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с рецептором глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1R), и к терапевтическим способам их применения, включая лечение гипогликемии.

Предпосылки создания изобретения

Бариатрические операции представляют собой эффективные варианты лечения пациентов с тяжелым ожирением. Каждый год только в Соединенных Штатах проводится около 44000 операций по шунтированию желудка и 138000 гастрэктомий. Успешная потеря веса после бариатрических операций часто приводит к улучшению чувствительности к инсулину. Улучшенная чувствительность к инсулину в сочетании с повышенным уровнем глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1) провоцирует развитие постпрандиальной гиперинсулинемической гипогликемии у части пациентов, перенесших операцию. Гипогликемия обычно характеризуется низким уровнем глюкозы в плазме во время появления симптомов и облегчением симптомов при повышении уровня глюкозы. Постбариатрическая гипогликемия (PBH) характеризуется постпрандиальной гипогликемией, которая развивается через 1-3 часа после еды. GLP1 секретируется в ответ на потребление пищи и активирует рецептор GLP1 (GLP1R) на бета-клетках поджелудочной железы, вызывая секрецию инсулина. Таким образом, повышенный уровень GLP1 играет критическую роль в развитии PBH. Поскольку количество бариатрических хирургических вмешательств во всем мире продолжает расти, все чаще сообщается о тяжелом осложнении - гиперинсулинемической гипогликемии. Например, сообщается, что симптоматическая гипогликемия возникает у 0,2~15% пациентов после обходного желудочного анастомоза и у 1~7% подвергнутых гастрэктомии пациентов через 0,5-10 лет после операции. Kellogg *et al.*, *Surg Obes Relat Dis.*, 4(4):492-99 (2008); Marsk *et al.*, *Diabetologia*, 53(11):2307-11 (2010); Nambron *et al.*, *WMJ*, 112(3):136 (2013); Lee *et al.*, *Obesity (Silver Spring)*, 23(5):1079-84 (2015); Gribsholt *et al.*, *Ugeskr Laeger*, 178(44) (2016); Sun *et al.*, *Surg Obes Relat Dis.*, 15(9):1439-1446 (2019).

GLP1 играет критическую роль при PBH, поскольку хирургические вмешательства приводят к увеличению секреции GLP1 из-за более быстрого

прохождения пищи в тонкую кишку, где расположены GLP1-продуцирующие L-клетки. В то время как повышенный уровень GLP1 обычно способствует послеоперационной потере веса у пациентов с ожирением, также могут возникать симптомы гипогликемии, включая адренергические эффекты (например, тремор, сердцебиение, тревога), холинергические эффекты (например, потливость, чувство голода, парестезии) и эффекты нейрогликопении (например, нарушение когнитивных функций, судороги и потеря сознания), особенно у лиц, достигших значительной потери веса после операции. У пациентов с рецидивирующей гипогликемией может наблюдаться резкое начало нейрогликопении, что может привести к серьезным падениям, дорожно-транспортным происшествиям, судорогам и потере сознания. Тяжелая РВН изнурительна и значительно ухудшает качество жизни. Современные варианты лечения РВН включают изменения диеты, акарбозу (блокатор переваривания крахмала), аналог соматостатина, нифедипин (блокатор кальциевых каналов), диазоксид и установку гастростомической трубки. Eisenberg *et al.*, *Surg Obes Relat Dis.*, 13(3):371-378 (2017). Растущие показатели патологического ожирения указывают на то, что случаи РВН будут расти как осложнение бариатрической хирургии.

Другие нарушения, заболевания и состояния также могут приводить к низким уровням глюкозы в плазме. Например, демпинг-синдром является частым осложнением операций на верхних отделах желудка (например, бариатрических операций, операций на пищеводе или желудке), при которых, по-видимому, главную роль играет GLP1. По оценкам, демпинг-синдром встречается у 40% пациентов после бариатрической хирургии (шунтирование желудка с гастроеюноанастомозом по Ру или рукавная резекция желудка), у 50% пациентов, перенесших эзофагэктомию для лечения рака пищевода, и у 75% пациентов, перенесших гастрэктомию для лечения рака желудка и язвенной болезни. Диагноз демпинг-синдрома может быть поставлен через несколько месяцев или лет после операции. Гиперинсулинемический ответ, вызванный GLP1, после приема углеводов приводит к симптомам, связанным с гипогликемией, таким как нейрогликопения (усталость, слабость, спутанность сознания, чувство голода и обмороки) и вегетативная/адренергическая реактивность (потливость, сердцебиение, тремор и раздражительность).

Гипогликемия, включая РВН, может иметь разную степень тяжести. На качество жизни существенно влияет тяжелая гипогликемия, при которой больные не могут оставаться одни, переезжать или заботиться о себе или других. Не существует одобренной или эффективной фармакологической терапии РВН или тяжелой

гипогликемии, которая является длительно действующей и не приводит к гипергликемии, а хирургическое вмешательство не всегда успешно устраняет гипогликемию. Следовательно, остается значительная и неудовлетворенная потребность в терапевтическом средстве, которое эффективно повышает уровень глюкозы в крови и, таким образом, может служить полезным средством лечения гипогликемии любого происхождения, включая РВН.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с белком рецептора глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1R). В некоторых вариантах осуществления антитела к GLP1R представляют собой полностью человеческие антитела, которые связываются с GLP1R с высокой аффинностью и блокируют связывание и/или активность GLP1R или дестабилизируют активированную конформацию. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению применимы, среди прочего, для инактивации или снижения активности белка GLP1R. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применимы для предупреждения, лечения или ослабления по меньшей мере одного симптома или признака заболевания или нарушения, связанного с GLP1R, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно вводить профилактически или терапевтически субъекту, имеющему или подверженному риску заболевания или нарушения, связанного с GLP1R, такого как РВН или другие типы гипогликемии любого происхождения. В конкретных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применяют для повышения уровней глюкозы у субъекта, нуждающегося в этом. Такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно применять в качестве терапии нарушения, такого как гипогликемия любого происхождения (например, постбариатрическая гипогликемия или гипогликемия, возникающая вследствие других операций на верхних отделах желудка, таких как эзофагэктомия, гастрэктомия по поводу рака желудка и пептических язв, и тому подобное, или гипогликемия, возникающая вследствие врожденной этиологии, такой как генетические аномалии), при введении субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления антитела-антагонисты GLP1 или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению имеют более длительный период полувыведения и сниженную иммуногенность по сравнению с другими терапевтическими средствами, такими как

эксендин (9-39) (Авекзитид, Eiger BioPharmaceuticals). В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем документе, связываются с GLP1R с высокой аффинностью и обладают улучшенными фармакокинетическими свойствами по сравнению со стандартными лекарственными средствами.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем документе, специфически связываются с GLP1R антагонистическим образом, то есть таким образом, что ослабляется или предотвращается, или блокируется связывание и/или активность GLP1R. Антитела являются эффективными в отношении повышения уровней глюкозы в крови и поддержания нормализованных уровней при введении нуждающемуся в этом субъекту. Однократная доза антитела по настоящему изобретению привела к устойчивым нормализованным уровням глюкозы в крови в течение 46 дней у мышей. Такие антитела можно применять для обеспечения высокой эффективности наряду с менее частым дозированием у субъекта с заболеванием или нарушением, связанным с GLP1R (*например*, гипогликемией).

Антитела по настоящему изобретению могут быть полноразмерными (*например*, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (*например*, фрагмент Fab, F(ab')₂ или scFv), и могут быть модифицированы для воздействия на функциональность, *например*, для повышения персистенции в организме хозяина или для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933). В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть биспецифическими.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенные рекомбинантные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с GLP1R.

В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой полностью человеческие моноклональные антитела.

Антагонисты GLP1R по настоящему изобретению применимы, среди прочего, для уменьшения активации GLP1R. В некоторых вариантах осуществления антагонисты GLP1R действуют путем снижения секреции инсулина и снижения уровней глюкозы в крови. В некоторых вариантах осуществления антагонисты GLP1R действуют путем ослабления индуцированной глюкозой секреции инсулина бета-клетками поджелудочной железы и снижения экспрессии инсулина. В некоторых вариантах осуществления антагонисты GLP1R применимы для предупреждения,

лечения или ослабления по меньшей мере одного симптома заболевания или нарушения, связанного с гипогликемией (*например*, РВН), у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые антитела-антагонисты против GLP1R и их антигенсвязывающие фрагменты существенно или полностью корректируют индуцированную эксендином-4 гипогликемию в течение более 45 дней после однократного дозирования, как показано в примере 5.

Иллюстративные антитела-антагонисты GLP1R по настоящему изобретению перечислены в таблицах 1 и 2 в настоящем документе. В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), областей, определяющих комплементарность тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и областей, определяющих комплементарность легкой цепи (LCDR) (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител. В таблице 2 представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител.

Настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90% по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие парную аминокислотную последовательность HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие парную

аминокислотную последовательность HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против GLP1R, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления парная аминокислотная последовательность HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID NO: 2/10 (*например*, mAb36986), 22/30 (*например*, mAb37639) и 40/48 (*например*, mAb37645).

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR и LCVR, при этом указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, имеющую не более двенадцати аминокислотных замен, и/или указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, имеющую не более десяти аминокислотных замен. Например, настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR и LCVR, при этом указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, при этом указанная аминокислотная последовательность имеет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать аминокислотных замен. В другом примере настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR и LCVR, при этом указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, перечисленную в таблице 1, при этом указанная аминокислотная последовательность имеет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен. В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитела против GLP1R или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR и LCVR, при этом указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, при этом указанная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену, и/или указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, при этом указанная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по

меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1, или по

существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие парную аминокислотную последовательность HCDR1 и LCDR1 (HCDR1/LCDR1), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие парную аминокислотную последовательность HCDR1/LCDR1, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против GLP1R, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR1/LCDR1 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4/12 (*например*, mAb36986), 24/32 (*например*, mAb37639) и 42/50 (*например*, mAb37645).

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие парную аминокислотную последовательность HCDR2 и LCDR2 (HCDR2/LCDR2), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие парную аминокислотную последовательность HCDR2/LCDR2, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против GLP1R, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR2/LCDR2 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6/14 (*например*, mAb36986), 26/14 (*например*, mAb37639) и 44/52 (*например*, mAb37645).

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие парную аминокислотную последовательность HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие парную

аминокислотную последовательность HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против GLP1R, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16 (*например*, mAb36986), 28/34 (*например*, mAb37639) и 46/54 (*например*, mAb37645).

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR и LCVR, при этом указанная HCVR содержит HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, представленной в таблице 1, на 1 аминокислоту, HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, представленной в таблице 1, на 1 аминокислоту, и HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, представленной в таблице 1, на 1 аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR и LCVR, при этом указанная LCVR содержит LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, представленной в таблице 1, на 1 аминокислоту, LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, представленной в таблице 1, на 1 аминокислоту, и LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, представленной в таблице 1, на 1 аминокислоту.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в таблице 3, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в таблице 3, или по существу подобную ей

последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие парную аминокислотную последовательность HC и LC (HC/LC), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в таблице 3, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в таблице 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие парную аминокислотную последовательность HC/LC, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против GLP1R, перечисленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HC/LC выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/20, 36/38 и 56/58.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных антител, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4/6/8/12/14/16 (*например*, mAb36986), 24/26/28/32/14/34 (*например*, mAb37639) и 42/44/46/50/52/54 (*например*, mAb37645). В сходном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3), содержащихся в парной аминокислотной последовательности HCVR/LCVR, как определено любым из иллюстративных антител, перечисленных в таблице 1. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3, содержащийся в парной аминокислотной последовательности HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (*например*, mAb36986), 22/30 (*например*, mAb37639) и 40/48 (*например*, mAb37645).

Способы и технологии идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и

могут быть применены для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Типичные соглашения, которые могут быть применены для определения границ CDR, включают, *например*, определение по Кабату, определение по Чотиа и определение по AbM. В общем случае, определение по Кабату основано на вариабельности последовательности, определение по Чотиа основано на местоположении структурных петлевых областей, а определение по AbM является компромиссом между подходами по Кабату и Чотиа. См., *например*, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); and Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Публичные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в антителе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GLP1R, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три области, определяющие комплементарность (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), где HCVR содержит: (i) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22 и 40; (ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22 и 40; (iii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22 и 40; или (iv) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22 и 40, при этом указанная аминокислотная последовательность имеет не более 12 аминокислотных замен; и LCVR содержит: (i) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30 и 48; (ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30 и 48; (iii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30 и 48; или (iv) аминокислотную последовательность, выбранную из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 10, 30 и 48, при этом указанная аминокислотная последовательность имеет не более 12 аминокислотных замен.

Настоящее изобретения включает антитела против GLP1R, имеющие модифицированный характер гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть применима модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, или отсутствие фукозного фрагмента на олигосахаридной цепи антитела, например, увеличивает антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) (см. Shield *et al.* (2002) JBC 277:26733). В других применениях может быть произведена модификация галактозилирования для изменения комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют pH-зависимое связывание с GLP1R. Например, настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с GLP1R с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH (*m.e.* связывание снижено при кислом pH).

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют за специфическое связывание с GLP1R с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, где HCVR и LCVR, каждая, имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в таблице 1.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые перекрестно конкурируют за связывание с GLP1R с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, где HCVR и LCVR, каждая, имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в таблице 1.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее три CDR HCVR и три CDR LCVR, где HCVR и LCVR, каждая, имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в таблице 1.

Настоящее изобретение также обеспечивает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые уменьшают или дестабилизируют связывание GLP1R с GLP1. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

которое блокирует связывание GLP1R с GLP1, может связываться с тем же эпитопом на GLP1R, что и GLP1, или может связываться с эпитопом на GLP1R, отличным от GLP1.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению являются биспецифическими, содержащими первую специфичность связывания с первым эпитопом GLP1R и вторую специфичность связывания со вторым эпитопом GLP1R, где первый и второй эпитопы являются различными и не перекрываются.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое обладает одной или несколькими из следующих характеристик: (a) является полностью человеческим моноклональным антителом; (b) связывается с человеческим GLP1R при 25°C с константой диссоциации (K_D) менее 6 нМ согласно измерениям в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR); (c) связывается с человеческим GLP1R при 37°C с K_D менее 20 нМ согласно измерениям в анализе SPR; (d) связывается с мономерным GLP1R яванского макака при 25°C с K_D менее 20 нМ согласно измерениям в анализе SPR; (e) связывается с мономерным GLP1R яванского макака при 37°C с K_D менее 60 нМ согласно измерениям в анализе SPR; (f) связывается с hdesA-GLP1_GLP1R-MMH при 25°C с K_D менее 18 нМ согласно измерениям в анализе SPR; (g) связывается с hdesA-GLP1_GLP1R-MMH при 37°C с K_D менее 75 нМ согласно измерениям в анализе SPR; (h) связывается с мономерным мышинным GLP1R при 25°C с K_D менее 22 нМ согласно измерениям в анализе SPR; (i) связывается с мономерным мышинным GLP1R при 37°C с K_D менее 75 нМ согласно измерениям в анализе SPR; (j) блокирует взаимодействие GLP1 и GLP1R со значением IC_{50} менее чем примерно 10 нМ согласно измерениям в *in vitro* анализе связывания рецептор/лиганд при 37°C; (k) уменьшает GLP1-индуцированную гипогликемию, не вызывая гипергликемию; и (l) повышает уровень глюкозы в крови до нормализованного уровня.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела против GLP1R или их фрагменты. Например, настоящее изобретение обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную ей

последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности. Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 % идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (*m.e.* HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 соответствует определению любого из иллюстративных антител, перечисленных в таблице 1.

Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (*m.e.* LCDR1-LCDR2-LCDR3), где набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответствует определению любого из иллюстративных антител, перечисленных в таблице 1.

Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из нуклеотидных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с этим аспектом молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где HCVR и LCVR получены из одного и того же антитела против GLP1R, указанного в таблице 1.

Настоящее изобретение обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи, перечисленных в таблице 3. Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей легкой цепи, перечисленных в таблице 3. Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как тяжелую цепь (HC), так и легкую цепь (LC), где HC содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в таблице 3, и где LC содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в таблице 3.

В родственном аспекте настоящее изобретение обеспечивает рекомбинантные векторы экспрессии, способные экспрессировать полипептид, содержащий переменную область тяжелой и/или легкой цепи антитела. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, *т.е.* молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, указанных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает

векторы экспрессии, содержащие: (а) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HCVR антитела, которое связывается с GLP1R, где HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, перечисленных в таблице 1; и/или (b) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую LCVR антитела, которое связывается с GLP1R, где LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, перечисленных в таблице 1. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих возможность продуцирования антител или фрагментов антител и извлечения антител и фрагментов антител, полученных таким образом. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева содержат клетку млекопитающего или прокариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO) или клетку *Escherichia coli* (*E. coli*). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Способы предусматривают введение в клетку-хозяина экспрессионного вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HCVR и/или LCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, функционально связанную с промотором; культивирование клетки-хозяина в условиях, благоприятных для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты; и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуральной среды и/или клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает введение в клетку-хозяина (*например*, клетки CHO) (а) первого экспрессионного вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, функционально связанную с промотором, и (2) второго экспрессионного вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую LCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, функционально связанную с промотором; культивирование клетки-хозяина в условиях, благоприятных для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты; и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуральной среды и/или клетки-хозяина.

Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно очистить с использованием любого из способов, известных в предшествующем уровне техники.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного рекомбинантного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с GLP1R, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте в изобретении обеспечена композиция, которая представляет собой комбинацию антитела против GLP1R и второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который целесообразно комбинировать с антителом против GLP1R, например, ингибитор инсулина или рецептора инсулина, блокатор переваривания крахмала (например, акарбоза), аналог соматостатина (например, октреотид, ланреотид), блокатор кальциевых каналов (например, нифедипин), диазоксид, глюкагон, агонист соматостатиновых рецепторов типа 5 или их комбинация. Иллюстративные агенты, которые можно с успехом комбинировать с антителом против GLP1R, включают, но без ограничения, другие агенты, которые связываются с GLP1R и/или дезактивируют его активность (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), и/или агенты, которые напрямую не связываются с GLP1R, но, тем не менее, лечат или облегчают по меньшей мере один симптом или признак заболевания или нарушения, связанного с GLP1R (раскрытые в другом месте в настоящем документе). Дополнительные комбинированные терапии и совместные составы, включающие антитела-антагонисты против GLP1R по настоящему изобретению, описаны в другом месте в настоящем документе.

Также, в настоящем документе обеспечены терапевтические способы лечения у субъекта заболевания или нарушения, связанного с GLP1R, с применением антитела-антагониста против GLP1R или его антигенсвязывающего фрагмента, где терапевтические способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, раскрытого в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту. Нарушение, подлежащее лечению, представляет собой любое заболевание или состояние, которое улучшается, облегчается, ингибируется или предотвращается за счет ослабления активности GLP1R (например, гипогликемия). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы предупреждения или лечения заболевания или нарушения,

связанного с GLP1R, предусматривающие введение терапевтически эффективного количества антитела против GLP1R или его антигенсвязывающего фрагмента, раскрытого в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить профилактически или терапевтически субъекту, имеющему или подверженному риску заболевания или нарушения, связанного с GLP1R. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту после хирургического вмешательства на верхних отделах желудка. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент может представлять собой агент, который помогает противодействовать возникновению или уменьшать любой возможный побочный эффект(ы), связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящем документе, если такой побочный эффект(ы) возникает. Антитело или его фрагмент можно вводить подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутривентриально, перорально или внутримышечно. Антитело или его фрагмент можно вводить в дозе от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент по настоящему изобретению можно вводить в одной или нескольких дозах, содержащих от 10 мг до 600 мг.

Настоящее изобретение также включает применение антитела против GLP1R или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения, при котором было бы полезно блокировать связывание и/или активность GLP1R – гипогликемии, такой как РВН.

Другие варианты осуществления станут очевидными после ознакомления с последующим подробным описанием.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой график, показывающий уровни глюкозы в крови (мг/дл) во время провокаций эксендином-4, проводимых на дни 1, 8, 22, 46 и 67 после введения антитела, как описано в исследовании *in vivo*, изложенном в примере 5 в настоящем документе.

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий площадь под кривой (AUC) уровней глюкозы в крови у мышей, получавших лечение антителом против GLP1R по

настоящему изобретению или эксендином-9 после провокации эксендином-4, как описано в примере 6 в настоящем документе.

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено описанными конкретными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, и что объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении или тестировании настоящего изобретения, теперь описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упоминаемые в настоящем документе, настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Определения

Термин «GLP1R» относится к рецептору глюкагоноподобного пептида-1 и включает рекомбинантный белок GLP1R или его фрагмент. GLP1R имеет последовательность из 463 остатков. Donnelly, *Br J Pharmacol*, 166(1):27–41 (2011). Глюкагоноподобный пептид-1 (GLP1) представляет собой пептидный гормон, состоящий из 31 аминокислоты, высвобождаемый L-клетками кишечника после потребления питательных веществ. Связывание GLP1 с GLP1R потенцирует индуцированную глюкозой секрецию инсулина бета-клетками поджелудочной железы, увеличивает экспрессию инсулина, ингибирует апоптоз бета-клеток, способствует неогенезу бета-клеток, снижает секрецию глюкагона, задерживает опорожнение желудка, способствует насыщению и увеличивает периферическую утилизацию глюкозы.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, взаимосвязанных дисульфидными связями (*т.е.* «молекул целого антитела»), а также его мультимеров (*например*, IgM) или его антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из

вариабельной области тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоит из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи («LCVR или «V_L») и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающимися с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В некоторых вариантах осуществления FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными с человеческими последовательностям зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе анализа расположенных параллельно двух или более CDR.

Также возможна замена одного или нескольких остатков CDR или пропуск одной или нескольких CDR. В научной литературе описаны антитела, в которых одна или две CDR могут не участвовать в связывании. В публикации Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9:133-139) были исследованы области контактирования антител с их антигенами на основании опубликованных кристаллических структур, и был сделан вывод о том, что примерно только от одной пятой до одной третьей части остатков CDR фактически контактируют с антигеном. В этой работе также обнаружено множество антител, в которых в одной или двух CDR отсутствовали аминокислоты, контактирующие с антигеном (см. также Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, могут быть идентифицированы на основании предшествующих исследований в областях CDR Кабата, лежащих за пределами CDR Чотиа, путем молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем. Отсутствующая CDR или ее остаток(остатки) обычно заменяется аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности человеческого антитела или консенсусной части таких последовательностей. Положения замены в CDR и заменяющие аминокислоты также могут быть выбраны эмпирически. Замены, произведенные эмпирически, могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

Полностью человеческие моноклональные антитела против GLP1R, описанные в настоящем документе, могут содержать одну или несколько аминокислотных замен,

вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелых и легких цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко выявить путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из находящихся в общем доступе баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей, причем одна или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных и/или CDR-областях мутированы по соответствующему остатку(ам) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или по соответствующему остатку(ам) другой последовательности человеческой зародышевой линии, или по консервативной аминокислотной замене соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности собирательно называются в настоящем документе как «мутации зародышевой линии»). Специалист в данной области, исходя из раскрываемых в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелых и легких цепей, легко может получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все каркасные и/или CDR остатки в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно до остатков, обнаруживаемых в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только некоторые остатки мутируют обратно до исходной последовательности зародышевой линии, *например*, только мутировавшие остатки, обнаруживаемые в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутировавшие остатки, обнаруживаемые в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков мутированы до соответствующих остатков отличной последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой было получено исходное антитело). Вместе с тем, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных и/или CDR областях, в которой, *например*, некоторые отдельные остатки мутированы до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие

остатки, которые отличаются из исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют до соответствующего остатка отличной последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать на предмет одного или нескольких желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или увеличенные антагонистические биологические свойства, уменьшенная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, охватываются настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также включает полностью человеческие моноклональные антитела против GLP1R, содержащие варианты любой из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющей одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антитела против GLP1R, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «человеческое антитело» или «полностью человеческое антитело» предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные области, полученные из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. Раскрытые в настоящем документе человеческие mAb могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые иммуноглобулиновыми последовательностями зародышевой линии человека (*например*, мутации, введенные в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Тем не менее, используемый в настоящем документе термин «человеческое антитело» или «полностью человеческое антитело» не подразумевает включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих (*например*, мыши), были привиты на человеческие последовательности FR. Термин включает антитела, полученные рекомбинантным путем у отличного от человека млекопитающего или в клетках отличного от человека

млекопитающего. Подразумевается, что термин не включает антитела, вырабатываемые в организме человека, или взятые из него.

Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантный» относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, созданным, экспрессированным, выделенным или полученным с помощью известных в данной области технологий или способов, таких как технология рекомбинантных ДНК, которые включают, *например*, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к антителам, экспрессируемым в системе экспрессии с применением отличного от человека млекопитающего (включая трансгенных отличных от человека млекопитающих, *например*, трансгенных мышей), или клеток (*например*, клеток CHO), или выделенным из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека.

Термин «специфически связывается» или «специфически связывается с» и т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться равновесной константой диссоциации, составляющей по меньшей мере примерно 1×10^{-8} М или менее (*например*, меньшая K_D означает более прочное связывание). Методы определения специфического связывания двух молекул хорошо известны в данной области и включают, *например*, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Как описано в настоящем документе, антитела были идентифицированы с помощью поверхностного плазмонного резонанса, *например*, BIACORE™, которые специфически связываются с GLP1R. Кроме того, мультиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в GLP1R и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя разными областями GLP1R, тем не менее считаются антителами, которые «специфически связываются», как используется в настоящем документе.

Термин «высокоаффинное» антитело относится к таким mAb, которые характеризуются аффинностью связывания с GLP1R, выраженной в K_D , составляющей по меньшей мере 10^{-8} М; предпочтительно 10^{-9} М; более предпочтительно 10^{-10} М, еще более предпочтительно 10^{-11} М согласно измерениям методом поверхностного плазмонного резонанса, *например*, в рамках системы BIACORE™ или ELISA с определением аффинности в растворе.

Под термином «низкая скорость диссоциации», « K_{off} » или « k_d » подразумевают антитело, которое диссоциирует от GLP1R с константой скорости $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее,

предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ или менее, согласно измерениям методом поверхностного плазмонного резонанса, *например*, в рамках системы BIACORE™.

Используемые в настоящем документе термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п. включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела» относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с белком GLP1R.

В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагменты антитела по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с фрагментом, таким как лиганд, или терапевтическим фрагментом («иммуноконъюгат»), вторым антителом против GLP1R или любым другим терапевтическим фрагментом, пригодным для лечения GLP1R-ассоциированного заболевания или нарушения.

Используемый в настоящем документе термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое практически не содержит других антител (Ab), имеющих отличные антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с GLP1R, или его фрагмент, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от GLP1R.

Используемый в настоящем документе термин «блокирующее антитело» или «антитело-антагонист» (или «антитело, снижающее или ослабляющее активность GLP1R», или «антитело, дестабилизирующее активированную конформацию») относится к антителу, связывание которого с GLP1R приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической активности GLP1R. Например, антитело по настоящему изобретению может повышать уровни глюкозы при введении нуждающемуся в этом субъекту.

Используемый в настоящем документе термин «поверхностный плазмонный резонанс» относится к оптическому явлению, которое позволяет проводить анализ взаимодействий биологических молекул в режиме реального времени путем выявления изменений концентрации белка на матрице биосенсора, например, с применением системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

Используемый в настоящем документе термин « K_D » предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в пределах варибельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и могут оказывать разные биологические эффекты. Термин «эпитоп» также относится к участку на антигене, на который реагируют В-и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, которую связывает антитело. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно представляют собой разновидность структурных эпитопов и содержат такие остатки, которые непосредственно влияют на аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, то есть состоящими из нелинейных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные группы на поверхности молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи из сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в некоторых вариантах осуществления могут обладать специфическими характеристиками трехмерной структуры и/или специфическими характеристиками заряда.

Используемый в настоящем документе термин «перекрестно конкурирует» означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном и ингибирует или блокирует связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Этот термин также включает конкуренцию между двумя антителами в обоих направлениях, т. е. первое антитело связывается и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В некоторых вариантах осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. Альтернативно, первое и второе антитела могут связываться с разными, но перекрывающимися эпитопами таким образом, что связывание одного антитела ингибирует или блокирует связывание второго антитела, например, за счет стерических затруднений. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерить с помощью известных в данной области способов, например, интерферометрического анализа биослоя в режиме реального времени без применения метки. Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена как

связывание второго антитела, показатель которого меньше фонового сигнала вследствие самосвязывания (где первое и второе антитела представляют собой одно и то же антитело). Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена, например, в виде % связывания второго антитела, показатель которого меньше исходного фонового сигнала вследствие самосвязывания (где первое и второе антитела представляют собой одно и то же антитело).

Термин «значительная степень идентичности» или «в значительной степени идентичный», когда речь идет о нуклеиновой кислоте или ее фрагменте, означает, что при оптимальном выравнивании, с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями, с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью), имеет место идентичность нуклеотидных последовательностей по меньшей мере по приблизительно 90% и более предпочтительно по меньшей мере по приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, согласно измерениям с помощью любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, характеризующаяся значительной степенью идентичности с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в некоторых случаях, кодировать полипептид с аналогичной или в значительной степени подобной аминокислотной последовательностью, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин «значительное подобие» или «в значительной степени подобный» означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с применением стандартных штрафов за открытие гэпа, характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется на другой аминокислотный остаток с боковой цепью (R-группа) с подобными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент

или степень подобия могут быть увеличены с внесением поправки на консервативную природу замены. Способы внесения такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с подобными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические боковые цепи с гидроксильной группой: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат, и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами для консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативное замещение представляет собой любое изменение с положительным значением в логарифмической таблице вероятностей PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.*, (1992) *Science* 256:1443-45. «Средне консервативное» замещение представляет собой любое изменение с неотрицательным значением в логарифмической таблице вероятностей PAM250.

Подобие последовательностей для полипептидов, как правило, определяют с применением программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков позволяет сопоставлять подобные последовательности с помощью определения подобия с учетом разных замен, делеций и других модификаций, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно применять с использованием параметров по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантным вариантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с применением FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между заданными последовательностями и искомыми последовательностями (Pearson (2000), *выше*).

Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей множество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности, BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Под фразой «терапевтически эффективное количество» подразумевают количество, которое обеспечивает требуемый эффект, для достижения которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения, и может быть установлено специалистом в данной области с применением известных методик (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Используемый в настоящем документе термин «субъект» относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, нуждающемуся в улучшении состояния, профилактике и/или лечении связанного с GLP1R заболевания или нарушения, такого как гипогликемия. Этот термин включает людей, которые имеют такое заболевание или нарушение, или находятся в группе риска.

Используемые в настоящем документе термины «лечить», «лечение» или «терапия» относятся к уменьшению или ослаблению тяжести по меньшей мере одного симптома или признака заболевания или нарушения, связанного с GLP1R (например, гипогликемии) за счет введения терапевтического агента, такого как антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту. Эти термины включают ингибирование прогрессирования заболевания или ухудшения симптома/признака. Термины также включают положительный прогноз заболевания, т.е. субъект может быть свободен от заболевания или может иметь ослабленное заболевание после введения терапевтического агента, такого как антитело по настоящему изобретению. Терапевтический агент можно вводить субъекту в терапевтической дозе.

Термины «предупреждать», «предупреждение» или «профилактика» относятся к ингибированию проявления заболевания или нарушения, связанного с GLP1R (например, гипогликемии), или любых симптомов или признаков такого заболевания или нарушения (например, низкие уровни глюкозы) при введении антитела по настоящему изобретению.

Антигенсвязывающие фрагменты антител

Если специально не указано иное, используемый в настоящем документе термин «антитело» следует понимать как охватывающий молекулы антител, содержащих две иммуноглобулиновые тяжелые цепи и две иммуноглобулиновые легкие цепи (т.е. «целые молекулы антител»), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Используемые в настоящем документе термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п. включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела» относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с белком GLP1R. Фрагмент антитела может включать фрагмент Fab, фрагмент $F(ab')_2$, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенный CDR. В некоторых вариантах осуществления термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидному фрагменту мульти-специфической антигенсвязывающей молекулы. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул целых антител с применением любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методы генетической инженерии, предусматривающие манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фагов-антител) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и с ней можно проводить манипуляции химическими способами или при помощи методов молекулярной биологии, например, для организации одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты $F(ab')_2$; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный

пептид FR3-CDR3-FR4. Также используемым в настоящем документе выражением «антигенсвязывающий фрагмент» охвачены другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триотела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунопрепараты на основе модульного белка с малым размером молекул (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или любой аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая является смежной с одной или несколькими каркасными последовательностями или находится в рамке считывания. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие примеры конфигураций переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любые из перечисленных выше иллюстративных конфигураций, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно соединены друг с другом, либо могут быть соединены при помощи полного или частичного шарнирного или линкерного участка. Шарнирный участок может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что в результате дает гибкую или полугибкую связи между смежными переменными и/или константными доменами в отдельной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) в любой из

перечисленных выше конфигураций переменных и константных доменов в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной связи(ей)).

Как и в случае с целыми молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере два различных переменных домена, причем каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с различным эпитопом на одном антигене. Любой мультиспецифический формат антитела, включая раскрытые в настоящем документе иллюстративные биспецифические форматы антител, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с помощью доступных в данной области стандартных методик.

Получение человеческих антител

Способы создания человеческих антител у трансгенных мышей известны в данной области. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с GLP1R.

Иммуноген, содержащий любой из следующих компонентов, можно использовать для создания антител к белку GLP1R. В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, получают от мышей, иммунизированных полноразмерным нативным белком GLP1R или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. Альтернативно, белок или его фрагмент можно получить с использованием стандартных биохимических методов, модифицировать и использовать в качестве иммуногена. В некоторых вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный белок GLP1R или его фрагмент, экспрессированный в *E. coli* или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка (CHO). [095] Используя технологию VELOCIMMUNE® (см., например, патентный документ US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любой другой известный способ создания моноклональных антител, первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к GLP1R, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® предусматривает создание трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий локусы

человеческих переменных областей тяжелых и легких цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышинных константных областей так, чтобы мышь в ответ на стимуляцию антигеном продуцировала антитело, содержащее человеческую переменную область и мышиную константную область. ДНК, кодирующую переменные области тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелых и легких цепей. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Как правило, мышь VELOCIMMUNE® провоцируют представляющим интерес антигеном, а лимфатические клетки (такие как В-клетки) выделяют у мышей, которые экспрессируют антитела. Лимфатические клетки могут быть слиты с линией миеломных клеток с получением бессмертных линий гибридных клеток, и такие линии гибридных клеток подвергают скринингу и отбирают для выявления линий гибридных клеток, которые продуцируют антитела, специфические к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделить и присоединить к необходимым изотипическим константным областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может продуцироваться в такой клетке, как клетка СНО. Альтернативно, ДНК, кодирующую антиген-специфические химерные антитела или переменные домены легких и тяжелых цепей, можно выделить непосредственно из антиген-специфических лимфоцитов.

Изначально выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Как и в приведенном ниже экспериментальном разделе, у антител определяют характеристики и отбирают по необходимым характеристикам, включая аффинность, избирательность, эпитоп и т.д. Мышинные константные области замещают необходимыми человеческими константными областями для создания полностью человеческого антитела по настоящему изобретению, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Несмотря на то, что выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики связывания антигена с высокой аффинностью и специфичности к мишени присущи переменной области.

Биоэквиваленты

Антитела-антагонисты против GLP1R и фрагменты антител по настоящему изобретению охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые

отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать белок GLP1R. Такие вариантные антитела и фрагменты антител содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но характеризуются биологической активностью, по существу эквивалентной активности описанных антител. Аналогичным образом, кодирующие антитело последовательности ДНК по настоящему изобретению охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые по существу биоэквивалентны антителу или фрагменту антитела, раскрытому в настоящем документе.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, в скорости и степени абсорбции которых не наблюдают существенного различия при введении в одинаковой молярной дозе при сходных экспериментальных условиях, либо в однократной дозе, либо в многократной дозе. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентными по степени их абсорбции, но не по скорости абсорбции, и их все же можно считать биоэквивалентными, так как такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и учтены при введении меток, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном приеме, и их считают незначительными с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они не имеют клинически значимых различий по их безопасности, чистоте или активности.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может менять один или несколько раз эталонный продукт и биологический продукт без предположительного повышения риска побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или сниженную эффективность по сравнению с продолжительной терапией без такой замены.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия по отношению к состоянию или условиям применения, при условии, что такие механизмы известны.

Биоэквивалентность можно продемонстрировать посредством способов *in vivo* и/или *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например, (a) тестирование *in vivo* на людях или других млекопитающих, при котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) тестирование *in vitro*, для которого установлена корреляция и оно является достаточно прогнозируемым по отношению к данным биологической доступности *in vivo* у человека; (c) тестирование *in vivo* на людях или других млекопитающих, при котором соответствующий быстрый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, при котором устанавливают безопасность, эффективность или биологическую доступность, или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты описанных в настоящем документе антител можно сконструировать, например, посредством создания различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, несущественные для биологической активности, можно удалить или заменить на другие аминокислоты для предупреждения формирования нежелательных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащие замены аминокислот, которые модифицируют характеристики гликозилирования у антител, например, мутации, которые исключают или удаляют участки гликозилирования.

Биологические характеристики антител

Как правило, антитела по настоящему изобретению функционируют путем связывания с белком GLP1R и снижения его активности. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с мономерным белком GLP1R человека (*например*, при 25°C или 37°C) с K_D менее 20 нМ, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, *например*, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем

документе. В некоторых вариантах осуществления эти антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с GLP1R с K_D менее чем примерно 20 нМ, менее чем примерно 18 нМ, менее чем примерно 10 нМ, менее чем примерно 7 нМ, менее чем примерно 6 нМ, менее чем примерно 5 нМ, менее чем примерно 4 нМ, менее чем примерно 3 нМ, менее чем примерно 2 нМ, менее чем примерно 1 нМ или менее чем примерно 0,5 нМ при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, *например*, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с мономерным GLP1R яванского макака (*например*, при 25°C или 37°C) с K_D менее 60 нМ, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, *например*, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления эти антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с GLP1R с K_D менее чем примерно 60 нМ, менее чем примерно 20 нМ, менее чем примерно 2 нМ, менее чем примерно 1 нМ или менее чем примерно 0,5 нМ при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или при 37°C, *например*, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с hdesA-GLP1_GLP1R-MMH (*например*, при 25°C или 37°C) с K_D менее 75 нМ, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, *например*, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления эти антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с GLP1R с K_D менее чем примерно 75 нМ, менее чем примерно 70 нМ, менее чем примерно 60 нМ, менее чем примерно 40 нМ, менее чем примерно 20 нМ или менее чем примерно 5 нМ, измеренные с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или при 37°C, *например*, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с мономерным GLP1R мыши (*например*, при 25°C или 37°C) с K_D менее 75 нМ, измеренной с помощью поверхностного плазмонного

резонанса, *например*, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления эти антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с GLP1R с K_D менее чем примерно 75 нМ, менее чем примерно 50 нМ, менее чем примерно 30 нМ, менее чем примерно 20 нМ или менее чем примерно 11 нМ согласно измерениям методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или при 37°C, *например*, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют взаимодействие GLP1 и GLP1R со значением IC_{50} менее чем примерно 10 нМ, измеренным в анализе связывания рецептор/лиганд *in vitro* при 37°C, описанном в примере 4 в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления эти антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют взаимодействие GLP1 и GLP1R со значением IC_{50} менее чем примерно 10 нМ, менее чем примерно 7 нМ или менее чем примерно 2 нМ при измерении в анализе связывания рецептор/лиганд *in vitro* при 37°C, описанном в примере 4, или аналогичном анализе.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с GLP1R и повышают уровни глюкозы в крови для снижения индуцированной GLP1 гипогликемии без вызывания гипергликемии при введении нуждающемуся в этом субъекту, *например*, как показано в примере 5 или 6 в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, раскрытые в настоящем документе, повышают уровень глюкозы в крови до нормализованного уровня. В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, раскрытые в настоящем документе, повышают уровень глюкозы в крови с начального уровня ниже 55 мг/дл до нормализованного уровня (*например*, выше 70 мг/дл). В таких вариантах осуществления повышение уровня глюкозы в крови до нормализованного уровня не вызывает гипергликемию.

Антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или несколькими вышеупомянутыми биологическими характеристиками или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны специалисту в данной области после ознакомления с настоящим изобретением, включая приведенные здесь рабочие примеры.

Картирование эпитопов и родственные методики

Настоящее изобретение включает антитела-антагонисты против GLP1R и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, обнаруженными в одной или нескольких областях молекулы белка GLP1R. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности, состоящей из 3 или более (*например*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в любом из вышеупомянутых доменов молекулы белка GLP1R (*например*, линейный эпитоп в домене). Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных внутри одного или обоих вышеупомянутых доменов молекулы белка (*например*, конформационный эпитоп).

Для определения того, «взаимодействует ли с одной или несколькими аминокислотами» антитело в полипептиде или белке, можно применять различные методики, известные специалистам в данной области. Иллюстративные методики включают, *например*, стандартные анализы перекрестного блокирования, такие как описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие способы включают анализ при помощи сканирующего аланином мутагенеза, пептидный блот-анализ (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248:443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и ЯМР-анализ. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопов, экстракция эпитопов и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9:487-496). Другим способом, который можно применять для определения аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водородно/дейтериевый обмен, определяемый посредством масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водородно/дейтериевого обмена предусматривает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом с антителом, подвергаются обратному обмену дейтерия-на-водород с более медленной скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью границы раздела. В результате, аминокислоты, которые формируют часть границы раздела белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, таким образом, характеризуются относительно более высокой массой по сравнению с аминокислотами,

не включенными в границу раздела. После диссоциации антитела белок-мишень подвергают расщеплению протеазами и масс-спектрометрическому анализу, таким образом выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267:252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Термин «эпитоп» относится к сайту на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы могут быть сформированы как из заменимых аминокислот, так и из незаменимых аминокислот, приведенных в соприкосновение в результате образования третичной структуры белка. Эпитопы, сформированные из заменимых аминокислот, обычно остаются под воздействием денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, сформированные в результате образования третичной структуры, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3 и чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Анализ антител на основе модификаций (MAP), также известное как анализ антител на основе структуры антигена (ASAP), является способом, с помощью которого классифицируют большое число моноклональных антител (mAb) к одному антигену в соответствии со схожестью профиля связывания для каждого антитела с поверхностями химически или ферментативно модифицированных антигенов (см. патент США 2004/0101920, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, который либо явно отличается от эпитопа, представленного в другой категории, либо частично перекрывается с ним. Такая методика позволяет быстро отфильтровывать генетически идентичные антитела так, чтобы характеристику можно было сфокусировать на генетически отличных антителах. Применительно к скринингу гибридом MAP может облегчить определение редких гибридомных клонов, которые продуцируют mAb с необходимыми характеристиками. MAP можно применять для разделения антител по настоящему изобретению на группы антител, связывающих различные эпитопы.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает антитела против GLP1R и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с одним или несколькими эпитопами, обнаруженными во внеклеточном домене GLP1R. Эпитоп(ы) может состоять из одной или нескольких непрерывных последовательностей, состоящих из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных во

внеклеточном домене GLP1R. Альтернативно эпитоп может состоять из множества незаменимых аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных внутри GLP1R.

Настоящее изобретение включает антитела против GLP1R, которые связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любое из конкретных иллюстративных антител, перечисленных в таблице 1. Аналогично, настоящее изобретение также включает антитела против GLP1R, которые конкурируют за связывание с белком GLP1R или его фрагментом с любым из конкретных иллюстративных антител, перечисленных в таблице 1. Например, настоящее изобретение включает антитела против GLP1R, которые перекрестно конкурируют за связывание с белком GLP1R с одним или несколькими антителами, перечисленными в таблице 1.

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело против GLP1R, или конкурирует за связывание с ним, используя стандартные способы, известные в данной области. Например, для определения того, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело против GLP1R по настоящему изобретению, эталонному антителу дают связаться с белком или пептидом GLP1R в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой белка GLP1R. Если тестируемое антитело способно связываться с GLP1R после насыщающего связывания с эталонным антителом к GLP1R, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с отличным эпитопом, чем эталонное антитело к GLP1R. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с белком GLP1R после насыщающего связывания с эталонным антителом к GLP1R, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый посредством эталонного антитела к GLP1R по настоящему изобретению.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом к GLP1R, осуществляют описанную выше методику связывания в двух ориентациях: согласно первой ориентации эталонному антителу позволяют связаться с белком GLP1R в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой GLP1R. Согласно второй ориентации тестируемому антителу позволяют связаться с молекулой GLP1R в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой GLP1R. Если в случае обеих ориентаций только первое (насыщающее) антитело

способно связываться с молекулой GLP1R, то можно прийти к заключению, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с GLP1R. Специалисту в данной области будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, не обязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, а может стерически блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания совпадающего или соседнего эпитопа.

Два антитела связываются с одинаковым или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. А именно, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, согласно измерениям в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 1990, 50:1495-1502). Альтернативно, два антитела характеризуются одинаковыми эпитопами, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого. Два антитела характеризуются перекрывающимися эпитопами, если несколько аминокислотных мутаций, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого.

Затем можно осуществить дополнительные стандартные эксперименты (например, анализы на мутации пептида и связывание) для подтверждения того, является ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела фактическим следствием связывания с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или является ли стерическое блокирование (или другое явление) ответственным за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода можно осуществить при помощи ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, который доступен в данной области.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком GLP1R, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися во внеклеточном домене GLP1R, как определено с помощью водородно/дейтериевого обмена, и при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с GLP1R и деактивирует его.

Иммуноконъюгаты

Настоящее изобретение относится к человеческому моноклональному антителу против GLP1R, конъюгированному с терапевтическим фрагментом («иммуноконъюгат»), для лечения связанного с GLP1R заболевания или нарушения (*например*, гипогликемии). Используемый в настоящем документе термин «иммуноконъюгат» относится к антителу, которое химически или биологически связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, нацеливающим или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом или белком или терапевтическим агентом. Антитело может быть связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, нацеливающим или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом или терапевтическим агентом в любом местоположении вдоль молекулы при условии, что оно способно связывать свою мишень. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитело-лекарственное средство и слитые белки антитело-токсин. В одном варианте осуществления агент может представлять собой второе отличное антитело к белку GLP1R. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом против GLP1R, будет зависеть от состояния, подлежащего лечению, и от требуемого терапевтического эффекта, который должен быть достигнут. Примеры подходящих агентов для образования иммуноконъюгатов известны в данной области. *См., например*, WO 05/103081.

Мультиспецифические антитела

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфичными к разным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные к более чем одному целевому полипептиду. *См., например*, Tutt *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

Любая из мультиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению или ее вариантов может быть сконструирована с применением стандартных методов молекулярной биологии (*например*, технологии рекомбинантных ДНК и экспрессии белка), как будет известно специалисту в данной области.

В некоторых вариантах осуществления GLP1R-специфические антитела-антагонисты получают в биспецифическом формате («биспецифические»), в котором переменные области, связывающиеся с отличающимися доменами белка GLP1R, соединены вместе для обеспечения специфичности в отношении двух доменов в

рамках одной связывающей молекулы. Сконструированные соответствующим образом биспецифические молекулы могут усиливать общую эффективность в отношении ингибирования белка GLP1R за счет повышения как специфичности, так и avidности связывания. Вариабельные области со специфичностью в отношении отдельных доменов (*например*, сегментов N-концевого домена), или которые могут связываться с разными областями в пределах одного домена, объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждой области одновременно связываться с отдельными эпитопами или с разными областями в пределах одного домена. В одном примере биспецифические вариабельные области тяжелой цепи (V_H) связывающей молекулы со специфичностью в отношении одного домена рекомбинируют с вариабельными областями легкой цепи (V_L) ряда связывающих молекул со специфичностью в отношении второго домена с целью идентификации неродственных партнеров V_L , которые можно объединить в пару с исходной V_H без нарушения исходной специфичности для такой V_H . Таким образом, один сегмент V_L (*например*, $VL1$) можно комбинировать с двумя разными доменами V_H (*например*, V_{H1} и V_{H2}) с получением биспецифической молекулы, состоящей из двух связывающих «плеч» (V_{H1} - V_{L1} и V_{H2} - V_{L1}). Применение одного сегмента V_L упрощает систему и, таким образом, облегчает осуществление применяемых для получения биспецифической молекулы процессов клонирования, экспрессии и очистки и повышает их эффективность. См., *например*, US 2011/0195454 и US 2010/0331527.

Альтернативно, антитела, которые связывают более чем один домен и вторую мишень, такую как, помимо прочего, *например*, второе отличное антитело против GLP1R, могут быть получены в биспецифическом формате с применением описанных в настоящем документе методик или других известных специалистам в данной области методик. Вариабельные области антитела, связывающиеся с отличающимися областями, могут быть соединены вместе с вариабельными областями, которые связываются с соответствующими участками, *например*, внеклеточного домена GLP1R, для обеспечения специфичности в отношении двух антигенов в рамках одной связывающей молекулы. Сконструированные соответствующим образом биспецифические молекулы такого типа выполняют двойную функцию. Вариабельные области со специфичностью в отношении внеклеточного домена комбинируют с вариабельной областью со специфичностью в отношении связывания за пределами внеклеточного домена, и объединяют их в пару на структурном каркасе, что позволяет каждой вариабельной области связываться с отдельными антигенами.

Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно применять в контексте настоящего изобретения, предусматривает применение первого С_H3-домена иммуноглобулина (Ig) и второго С_H3-домена Ig, где первый и второй С_H3-домены Ig отличаются от друг друга по меньшей мере по одной аминокислоте, и где отличие по меньшей мере по одной аминокислоте обуславливает снижение способности связывания биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, не характеризующимся таким отличием по аминокислоте. В одном варианте осуществления первый С_H3-домен Ig связывает белок А, а второй С_H3-домен Ig содержит мутацию, которая уменьшает или устраняет способность связывания с белком А, такую как модификация Н95R (согласно IMGT-нумерации мутаций в экзонах; Н435R согласно EU-нумерации). Второй С_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые могут быть обнаружены во втором С_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EC) в случае IgG2-антител; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EC) в случае IgG4-антител. Варианты описанного выше формата биспецифического антитела рассматриваются в рамках настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, включают, но без ограничения, *например*, биспецифические форматы на основе scFv или в виде диатела, в виде слияний IgG-scFv, Ig с двойными переменными доменами (DVD), Quadroma, антитела со структурой выступ во впадину, антитела с общей легкой цепью (*например*, антитела с общей легкой цепью со структурой выступ во впадину и т.д.), CrossMab, CrossFab, полученного на основе технологии SEED антитела, антитела, полученного путем опосредованной лейциновой застежкой димеризации, Duobody, IgG1/IgG2, IgG с Fab двойного действия (DAF) и биспецифические форматы Mab² (см., *например*, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11 и цитируемые в ней ссылки, для обзора вышеупомянутых форматов). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с применением конъюгирования пептид/нуклеиновая кислота, например, где применяют аминокислоты не природного происхождения с перекрестной химической активностью для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые

затем самособираются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. См., например, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012].

Терапевтическое введение и составы

Настоящее изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим антитела-антагонисты против GLP1R или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Терапевтические композиции в соответствии с изобретением будут вводиться с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые включают в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Такие составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липид (катионный или анионный) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии типа масло в воде и вода в масле, Carbowax в виде эмульсий (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие Carbowax. См. также Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может варьироваться в зависимости от возраста и размера субъекта, которому его будут вводить, целевого заболевания, состояния, пути введения и т.п. Когда антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению применяют для лечения заболевания или нарушения у взрослого пациента, или для предупреждения такого заболевания, целесообразно вводить антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обычно в виде однократной дозы, составляющей от около 0,1 до около 100 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния можно корректировать частоту и продолжительность лечения. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно вводить в виде начальной дозы, составляющей по меньшей мере от примерно 0,1 мг до примерно 800 мг, от примерно 1 до примерно 600 мг, от примерно 5 до примерно 500 мг или от примерно 10 мг до примерно до 400 мг. В некоторых вариантах осуществления за начальной дозой может следовать введение второй или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента в количестве, которое может быть примерно таким же или меньшим, чем количество начальной дозы, где введение последующих доз разделено промежутком времени, составляющим от по меньшей мере 1 дня до 3 дней; по меньшей мере одну неделю; по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель; или по меньшей мере 14 недель.

Известны различные системы доставки, которые могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, *например*, включение в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., *например*, Wu *et al.* (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают, но без ограничения, внутрикожный, трансдермальный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути введения. Композицию можно вводить любым подходящим путем, например путем инфузии или болюсной инъекции, за счет абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (*например*, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и тонкой кишки и т.д.), и может быть введена вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическая композиция также может быть доставлена в составе везикулы, в частности, липосомы (см., *например*, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533).

В настоящем документе также рассматривается использование наночастиц для доставки антител и их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению. Наночастицы, конъюгированные с антителами, можно использовать как в терапевтических, так и в диагностических целях. Наночастицы, конъюгированные с антителами, и способы получения и применения подробно описаны Arguebo *et al.*, 2009, "Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications," *J. Nanomat.*, Vol. 2009, Article ID 439389, 24 pages. Наночастицы могут быть разработаны и конъюгированы с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для нацеливания на клетки. Наночастицы для доставки лекарственных средств также описаны, *например*, в US 8257740 или US 8246995.

В определенных случаях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления

можно применять помпу. В другом варианте осуществления можно применять полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена вблизи мишени композиции, благодаря чему требуется лишь часть системной дозы.

Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутримозговых, внутримышечных и внутримышечных инъекций, капельных вливаний и т.д. Такие инъекционные препараты могут быть изготовлены общеизвестными способами.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, для доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению без труда можно применять устройство для доставки в виде шприц-ручки. Такое устройство для доставки в виде шприц-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки в виде шприц-ручки обычно используется сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена и картридж оказался пустым, пустой картридж без труда можно выбросить и заменить на новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После этого устройство доставки в виде шприц-ручки можно использовать повторно. В одноразовом устройстве для доставки в виде шприц-ручки нет сменного картриджа. Вместо этого одноразовое устройство для доставки в виде шприц-ручки выпускается предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После того как в резервуаре исчерпывается фармацевтическая композиция, все устройство выбрасывается.

Преимущественно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения составляют в лекарственные формы со стандартной дозой, соответствующей дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы со стандартной дозой включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антитела обычно составляет от около 5 до около 500 мг на лекарственную форму со стандартной дозой; в случае форме для инъекций является предпочтительным, чтобы антитело содержалось в количестве от примерно 5 до примерно 300 мг, и от примерно 10 до примерно 300 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические области применения антител

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно применять для лечения и/или предупреждения заболевания, нарушения или состояния, связанного с GLP1R, и/или для облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с таким заболеванием, нарушением или состоянием. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно вводить в терапевтической дозе пациенту, имеющему заболевание, нарушение или состояние, связанное с GLP1R. Неограничивающие примеры заболеваний, нарушений или состояний, которые можно лечить, предупреждать или ослаблять с использованием антител и их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению, включают гипогликемию любого происхождения, такую как РВН, или гипогликемию, возникающую вследствие других хирургических операций на верхних отделах желудка (например, эзофагэктомия, гастрэктомия при раке желудка и язвенной болезни), гиперинсулинизм (например, врожденный гиперинсулинизм), рецидивирующую гипогликемию, постпрандиальную гипогликемию, гиперсекрецию инсулина у пациентов с рецидивирующей гипогликемией после желудочного шунтирования и гипогликемию как симптом позднего демпинг-синдрома.

Гипогликемия (например, РВН) представляет собой нарушение, которое характеризуется низким уровнем сахара в крови с повышенными уровнями или без повышенных уровней инсулина. При РВН гипогликемия обычно возникает у субъектов через 1-3 часа после еды. Гипогликемия легкой и средней степени тяжести проявляется в виде гипогликемических симптомов, подтверждаемых концентрациями глюкозы в крови <70 мг/дл. Тяжелая гипогликемия проявляется в виде нейрогликопенических симптомов, что подтверждается концентрациями глюкозы в крови <55 мг/дл. Симптомы нейрогликопении могут включать спутанность сознания, потерю внимания, утомляемость, атаксию, паралич, судороги или потерю сознания. У субъектов с гипогликемией также могут возникать другие симптомы, такие как вазомоторные симптомы (например, потливость и дрожь) и/или адренергические симптомы (например, учащенное сердцебиение).

В некоторых вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно применять для лечения, ослабления или предупреждения гипогликемии, такой как РВН, или гипогликемии, возникающей вследствие других хирургических операций на верхних отделах желудка, таких как

эзофагэктомия, гастрэктомия по поводу рака желудка и пептических язв и т.п., или гипогликемии, возникающей в результате врожденной этиологии, такой как генетические аномалии). В настоящем документе также предполагается профилактическое применение одного или нескольких антител по настоящему изобретению у субъектов, подверженных риску страдания от низкого уровня глюкозы или гипогликемии.

В одном варианте осуществления рассматриваемые антитела и их антигенсвязывающие фрагменты применяют для изготовления фармацевтической композиции или лекарственного средства для лечения пациентов, страдающих заболеванием, нарушением или состоянием, раскрытых в настоящем документе (например, низкий уровень глюкозы или гипогликемия). В другом варианте осуществления рассматриваемые антитела и их антигенсвязывающие фрагменты применяют в качестве дополнительной терапии с любым другим агентом или любой другой терапией, известной специалистам в данной области, применимой для лечения или ослабления заболевания, нарушения или состояния, раскрытого в настоящем документе (например, низкого уровня глюкозы или гипогликемии).

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как создавать и применять способы и композиции по настоящему изобретению, и не подразумевается, что они ограничивают объем того, что авторы считают своим изобретением. Аналогично, изобретение не ограничивается какими-либо конкретными предпочтительными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, модификации и вариации вариантов осуществления могут быть очевидны специалистам в данной области техники после прочтения этого описания и могут быть выполнены без отклонения от его сущности и объема. Были предприняты усилия для обеспечения точности по отношению к применяемым числам (например, количества, температура и т.д.), но некоторые экспериментальные ошибки и отклонения должны быть приняты в расчет. Если не указано иное, части являются частями по массе, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура выражена в градусах по Цельсию, комнатная температура составляет около 25°C, и давление является или близко к атмосферному.

ПРИМЕР 1: Создание человеческих антител к глюкагоноподобному пептидному рецептору 1 (GLP1R)

Человеческие антитела к белку GLP1R создавали у мышей VELOCIMMUNE®, содержащих ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой каппа-цепи человеческого иммуноглобулина. Мышей иммунизировали стабилизированным полноразмерным белком GLP1R.

Опосредованный антителами иммунный ответ наблюдали с помощью GLP1R-специфического иммунологического анализа. Когда желаемый иммунный ответ был достигнут, спленоциты собирали и сливали с мышинными клетками миеломы, чтобы сохранить их жизнеспособность и сформировать клеточные линии гибридомы. Клеточные линии гибридомы подвергали скринингу и отбирали для идентификации клеточных линий, продуцирующих GLP1R-специфические антитела. Клеточные линии использовали для получения нескольких химерных антител против GLP1R (*т.е.* антител, обладающих человеческими переменными доменами и мышинными константными доменами).

Антитела против GLP1R также выделяли непосредственно из антиген-позитивных В-клеток мыши (описано в патенте США 2007/0280945A1). Используя этот способ, было получено несколько полностью человеческих антител против GLP1R (*т.е.* антител, обладающих человеческими переменными доменами и человеческими константными доменами).

Иллюстративные антитела, созданные, как описано выше, были обозначены как mAb36986, mAb37639 и mAb37645. Биологические свойства иллюстративных антител, созданных в соответствии со способами этого примера, дополнительно описаны в приведенных ниже примерах.

ПРИМЕР 2: Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей

В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, и CDR выбранных антител-антагонистов против GLP1R по настоящему изобретению.

Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антител	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb36986	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb37639	22	24	26	28	30	32	14	34
mAb37645	40	42	44	46	48	50	52	54

Идентификаторы соответствующих последовательностей нуклеиновых кислот представлены в таблице 2.

Таблица 2: Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

	SEQ ID NO:							
Обозначение антител	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb36986	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb37639	21	23	25	27	29	31	13	33
mAb37645	39	41	43	45	47	49	51	53

Антитела, упоминаемые в настоящем документе, обычно имеют полностью человеческие вариабельные области, но могут иметь человеческие или мышинные константные области. Специалистам в данной области будет понятно, что антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть превращено в антитело с другим изотипом Fc (*например*, антитело с Fc IgG1 мыши может быть превращено в антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае вариабельные домены (включая CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в таблице 2, останутся теми же, и ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или по существу сходными независимо от природы домена Fc. В некоторых вариантах осуществления выбранные антитела с Fc IgG1 мыши превращают в антитела с Fc IgG4 человека.

В таблице 3 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей выбранных антител против GLP1R с Fc IgG4 человека.

Таблица 3: Идентификаторы аминокислотных последовательностей

	SEQ ID NOs:	
Обозначение антитела	Тяжелая цепь	Легкая цепь
mAb36986	18	20
mAb37639	36	38
mAb37645	56	58

ПРИМЕР 3: Связывание моноклонального антитела против GLP1R с GLP1R, определенное с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C и 37°C

Константу равновесной диссоциации (K_D) для связывания GLP1R с выбранными моноклональными антителами (mAb) против GLP1R определяли с использованием биосенсора поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени с помощью прибора Biacore 4000. Все исследования связывания проводили в рабочем буфере, содержащем 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET) при 25°C и 37°C. Сначала поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 дериватизировали путем аминного сочетания с мышинным mAb, специфическим к Fc человека, для захвата различных mAb GLP1R. Различные концентрации (100, 25 и 6,25 nM) N-концевой области GLP1R-MMH человека (hGLP1R-MMH; SEQ ID NO: 59), GLP1R человека, экспрессируемого с IgG2a Fc мыши (hGLP1R-mFc; SEQ ID NO: 63), последовательно слитого белка desA-GLP1 человека и GLP1R-MMH (hdesA-GLP1_GLP1R-MMH; SEQ ID NO: 62), *tasaca fascicularis* GLP1R-MMH (mfGLP1R-MMH; SEQ ID NO: 60) или 100 nM GLP1R-MMH мыши (mGLP1R-MMH; SEQ ID NO: 61), приготовленные в рабочем буфере HBS-ET, инъецировали на захваченную поверхность GLP1R mAb в течение 150 с при скорости потока 30 мкл/мин и их диссоциацию в рабочем буфере HBS-ET наблюдали в течение 10 минут. В конце каждого цикла поверхность захвата mAb GLP1R регенерировали с помощью 12-секундной инъекции 20 mM фосфорной кислоты.

Скорость ассоциации (k_a) и скорость диссоциации (k_d) определяли путем подгонки сенсограмм связывания в режиме реального времени к модели связывания 1:1 с ограничением массопереноса с использованием программного обеспечения Scrubber 2.0c для подгонки кривой. Равновесную константу диссоциации (K_D), описывающую связывание, и диссоциативный период полужизни ($t_{1/2}$) рассчитывали на основе кинетических скоростей следующим образом:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a} \quad \text{и} \quad t_{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

Параметры кинетики связывания для связывания GLP1R с выбранными mAb GLP1R при 25°C и 37°C показаны в таблицах с 4 по 13.

Таблица 4: Параметры кинетики связывания выбранных моноклональных антител (mAb) к GLP1R, связывающихся с hGLP1R-MMH при 25°C.

mAb захваченные	mAb Уровень захвата	100 nM hGLP1R-MMH Связанные	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
-----------------	---------------------	-----------------------------	--------------	-------------	-----------	-----------------

	(RU)	(RU)				
mAb36986	350 ± 3,3	115	7,17E+05	9,97E-05	1,39E-10	116
mAb37639	332 ± 2,1	103	3,93E+05	1,86E-04	4,74E-10	62
mAb37645	246 ± 0,5	60	1,52E+05	8,66E-04	5,72E-09	13

Таблица 5: Параметры кинетики связывания выбранных моноклональных антител (mAb) к GLP1R, связывающихся с hGLP1R-ММН при 37°C.

mAb Захваченные	mAb Уровень захвата (RU)	100 нМ hGLP1R-ММН Связанные (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb36986	415 ± 5,2	135	9,15E+05	5,44E-04	5,94E-10	21
mAb37639	388 ± 1,8	123	6,68E+05	4,22E-04	6,32E-10	27
mAb37645	298 ± 1,3	70	1,95E+05	3,49E-03	1,80E-08	3.3

Таблица 6: Параметры кинетики связывания выбранных моноклональных антител (mAb) к GLP1R, связывающихся с hGLP1R-mFc при 25°C.

mAb Захваченные	mAb Уровень захвата (RU)	100 нМ hGLP1R-mFc Связанные (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb36986	345 ± 0,8	187	1,04E+05	7,64E-05	7,35E-10	151
mAb37639	331 ± 0,8	122	6,59E+04	1,56E-04	2,37E-09	74
mAb37645	245 ± 0,6	91	1,28E+05	1,83E-04	1,42E-09	63

Таблица 7: Параметры кинетики связывания выбранных моноклональных антител (mAb) к GLP1R, связывающихся с hGLP1R-mFc при 37°C.

mAb Захваченные	mAb Уровень захвата (RU)	100 нМ hGLP1R-mFc Связанные (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb36986	405 ± 2	246	1,29E+05	4,32E-04	3,35E-09	27
mAb37639	384 ± 0,6	185	1,01E+05	3,54E-04	3,52E-09	33
mAb37645	297 ± 1,3	116	2,51E+05	6,50E-04	2,59E-09	18

Таблица 8: Параметры кинетики связывания выбранных моноклональных антител (mAb) к GLP1R, связывающихся с mfGLP1R-ММН при 25°C.

mAb Захваченные	mAb Уровень захвата (RU)	100 нМ mfGLP1R- ММН связанные (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb36986	347 ± 1,3	103	2,40E+05	1,02E-04	4,24E-10	113
mAb37639	331 ± 1,2	83	1,37E+05	1,95E-04	1,42E-09	59
mAb37645	246 ± 0,8	35	4,22E+04	8,26E-04	1,96E-08	14

Таблица 9: Параметры кинетики связывания выбранных моноклональных антител (mAb) к GLP1R, связывающихся с mfGLP1R-ММН при 37°C.

mAb Захваченные	mAb Уровень захвата (RU)	100 нМ mfGLP1R- ММН Связанные (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb36986	407 ± 2,2	128	3,15E+05	5,01E-04	1,59E-09	23
mAb37639	385 ± 0,7	110	2,15E+05	4,18E-04	1,94E-09	28
mAb37645	298 ± 1,8	42	6,95E+04	3,84E-03	5,52E-08	3,0

Таблица 10: Параметры кинетики связывания выбранных моноклональных антител (mAb) к GLP1R, связывающихся с hdesA-GLP1_GLP1R-ММН при 25°C.

mAb Захваченные	mAb Уровень захвата (RU)	100 нМ hdesA- GLP1_GLP1R- ММН связанные (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb36986	347 ± 0,6	13	3,04E+04	1,08E-04	3,56E-09	107
mAb37639	331 ± 0,5	8	1,19E+04	1,90E-04	1,60E-08	61
mAb37645	245 ± 0,6	58	1,20E+05	5,20E-04	4,32E-09	22

Таблица 11: Параметры кинетики связывания выбранных моноклональных антител (mAb) к GLP1R, связывающихся с hdesA-GLP1_GLP1R-ММН при 37°C.

mAb Захваченные	mAb Уровень захвата (RU)	100 нМ hdesA- GLP1_GLP1R- ММН Связанные (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb36986	410 ± 0,4	28	1,63E+04	9,87E-04	6,04E-08	12
mAb37639	386 ± 1,1	21	1,71E+04	1,27E-03	7,42E-08	9
mAb37645	297 ± 0,6	71	1,39E+05	2,29E-03	1,65E-08	5,0

Таблица 12: Параметры кинетики связывания выбранных моноклональных антител (mAb) к GLP1R, связывающихся с mGLP1R-ММН при 25°C.

mAb Захваченные	mAb Уровень захвата (RU)	100 нМ mGLP1R-ММН Связанные (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb36986	345 ± 0,6	88	4,49E+05	9,02E-03	2,01E-08	1,3
mAb37639	330 ± 0,8	85	2,69E+05	4,54E-03	1,69E-08	2,5
mAb37645	244 ± 0,3	30	5,69E+04	6,17E-04	1,08E-08	19

Таблица 13: Параметры кинетики связывания выбранных моноклональных антител (mAb) к GLP1R, связывающихся с mGLP1R-ММН при 37°C.

mAb Захваченные	mAb Уровень захвата (RU)	100 нМ mGLP1R-ММН Связанные (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb36986	405 ± 0,8	70	6,49E+05	4,85E-02	7,47E-08	0,24
mAb37639	383 ± 0,2	97	4,35E+05	9,59E-03	2,21E-08	1,2
mAb37645	296 ± 0	42	8,36E+04	2,49E-03	2,98E-08	4,6

ПРИМЕР 4: Функциональное ингибирование GLP1R человека

Этот пример относится к функциональному ингибированию GLP1R человека в клеточном биоанализе с клетками HEK293/FSC11/pCDNA3.1+GLP1R+1 нМ GLP1, активированными hGLP1, с использованием следующих антител-антагонистов против GLP1R: mAb36986, mAb37639 и mAb37645.

GLP1R является представителем секретинового семейства (класс B) рецепторов, связанных с G-белком (GPCR). После связывания своего лиганда, GLP1, GLP1R инициирует нижестоящий сигнальный каскад через G-белки Gas, который повышает уровни внутриклеточного циклического AMP (сAMP), что приводит к регуляции транскрипции генов (Donnelly, *Br J Pharmacol*, 166(1):27–41 (2011)). Для оценки ингибирования GLP1R антителами против hGLP1R был проведен биоанализ в клетках HEK293 (эмбриональная линия клеток почки человека 293, ATCC), трансфицированных для стабильной экспрессии репортерного гена [элемент ответа сAMP (4X)-люцифераза-IRES-GFP] вместе с полноразмерным GLP1R человека. Полученная клеточная линия была названа HEK293/FSC11/pCDNA3.1+GLP1R +1nM GLP (ACL#6822, Regeneron), и в дальнейшем обозначается как HEK293/CRE-luc/GLP1R.

Для биоанализа клетки HEK293/CRE-luc/GLP1R высевали при 20000 клеток на лунку в аналитической среде (среда Opti-MEM, содержащая 0,1% фетальной бычьей сыворотки и 1X пенициллин-стрептомицин-глутамин) и инкубировали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. На следующий день выбранные антитела против GLP1R или изотипическое контрольное антитело серийно разбавляли в аналитической среде 1:3 от 300 нМ до 5,08 пМ (с дополнительной лункой только для аналитической среды без тестируемой молекулы) и предварительно инкубировали с клетками HEK293/CRE-luc/GLP1R в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂. Амид эксендина-3 (9-39) (Tocris, номер по каталогу 2081), именуемый далее как эксендин-9, серийно разбавляли в

аналитической среде 1:3 от 500 нМ до 8,47 пМ (с дополнительной лункой без тестируемой молекулы) и предварительно инкубировали с клетками в течение 30 минут при 37°C в 5%CO₂. Через 30 минут к клеткам добавляли амид GLP-1 (7-36) (Phoenix Pharmaceuticals, номер по каталогу 028-11), далее именуемый как GLP1, при постоянной концентрации 40 мкМ в аналитической среде. GLP1 также серийно разбавляли в аналитической среде 1:3 от 100 нМ до 1,69 пМ (с дополнительной лункой без тестируемой молекулы) и добавляли к клеткам, не обработанным антителами или эксендином-9, для ответа лиганда на дозу. После 5-часовой инкубации при 37°C в 5% CO₂ активность люциферазы оценивали путем добавления реагента системы анализа люциферазы ONEGLO™ (Promega, номер по каталогу E6130) и измеряли относительные единицы люминесценции (RLU) с помощью ридера Envision Plate (Perkin Elmer). Результаты анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрическое логистическое уравнение) программного обеспечения PRISM® 7 с получением значений EC₅₀ и IC₅₀. Процентное ингибирование рассчитывали по следующему уравнению:

$$\% \text{ Ингибирование} = 100 \times ((RLU_{GLP1} - RLU_{\text{ингибирование}}) / (RLU_{GLP1} - RLU_{\text{без контроля GLP1}}))$$

В приведенном выше уравнении «RLU_{GLP1}» относится к значению относительной единицы люминесценции (RLU) для клеток, обработанных 40 пМ GLP1 без антител. «RLU_{ингибирование}» относится к самому низкому значению RLU, измеренному при максимальной концентрации антитела или эксендина-9 в ответ на дозу 40 пМ GLP1. «RLU_{без контроля GLP1}» относится к значению RLU клеток, измеренному в отсутствие GLP1, эксендина-9 или антител.

Результаты. Три антитела против GLP1R тестировали на ингибирование клеток HEK293/CRE-luc/GLP1R, активированных 40 пМ GLP1. Как показано в таблице 14, два антитела против GLP1R, mAb36986 и mAb37639, показали 100% ингибирование со значениями IC₅₀ 1,69 нМ и 6,55 нМ, соответственно. mAb37645 ингибировало активацию GLP1R на 73% со значением IC₅₀ 1,23 нМ. Изотипическое контрольное mAb не показало ингибирования. Эксендин-9 показал 100% ингибирование со значением IC₅₀ 29,4 нМ. GLP1 активировал клетки со значением EC₅₀ 44,6 пМ.

Таблица 14: Ингибирование антителом против GLP1R активации человеческого GLP1R на клетках HEK293/CRE-luc/GLP1R с помощью 40 пМ GLP1

GLP1 EC ₅₀ [M] = 4.46E-11		
Антитело или пептид	% Ингибирование	IC ₅₀ [M]
mAb36986	100	1,69E-09
mAb37639	100	6,55E-09
mAb37645	73	1,23E-09
Изотипическое контрольное mAb	Нет ингибирования	Нет ингибирования
Эксендин-9	100	2,94E-08

ПРИМЕР 5: Влияние антител-антагонистов GLP1R на индуцированную эксендином-4 гипогликемию у гуманизированных GLP1R мышей

Этот пример относится к исследованию *in vivo* с использованием следующих антител-антагонистов против GLP1R: mAb36986, mAb37639 и mAb37645.

Для определения повышающих уровень глюкозы эффектов антител-антагонистов против GLP1R на GLP1-индуцированную гипогликемию, 6-месячным мышам-самцам, гомозиготным по экспрессии человеческого GLP1R вместо мышинового GLP1R (называемых гуманизированными GLP1R мышами), однократно вводили выбранные антитела против GLP1R и периодически провоцировали аналогом GLP1, эксендином-4 (Sigma, номер по каталогу E7144), в течение следующих 67 дней.

Для исследования 35 мышей случайным образом разделяли на одну группу из четырнадцати мышей и три группы из семи мышей. На день 0 группе из четырнадцати животных (позже разделенной на группы 1 и 2) вводили подкожно (s.c.) изотипическое контрольное антитело mIgG2 (называемое как изотипический контроль, доза 25 мг/кг), тогда как другим трем группам (n=7/группу) вводили подкожно (доза 25 мг/кг) mAb36986 (группа 3), mAb37639 (группа 4) или mAb37645 (группа 5). На следующий день (день 1) четырнадцать животных, которым вводили изотипический контроль, случайным образом разделяли на две группы (группа 1 и 2) по семь мышей в каждой. На 0-й минуте дня 1 животным в группе 1 вводили внутривенно (i.p.) физиологический раствор, тогда как животным в группе 2 вводили внутривенно эксендин-4 (доза 0,01 мг/кг). В этот же момент времени животным в 3, 4 и 5 группах вводили внутривенно эксендин-4 (доза 0,01 мг/кг). У всех животных уровни глюкозы в крови измеряли с помощью ручного глюкометра непосредственно перед введением физиологического раствора или эксендина-4, и через 15, 30, 60 и 120 минут после введения. Все животные оставались в назначенных им группах до завершения исследования на день 67. Провокацию эксендином-4, проведенную на день 1,

повторяли на дни 8, 22, 46 и 67. В таблице 15 показаны средние значения $\pm$ SEM уровней глюкозы в крови в каждый момент времени, рассчитанные для каждой группы. В таблице 16 показаны средние значения $\pm$ SEM процентных различий в уровнях глюкозы в крови от группы 1 в каждый момент времени, рассчитанных для каждой группы. Статистические анализы проводили с помощью двухфакторного ANOVA с последующим post-hoc анализом с помощью теста Бонферрони, сравнивающие группы 2, 3, 4 и 5 с группой 1.

У животных, которым вводили изотипический контроль на день 0 и физиологический раствор в дни провокации эксендином-4 (группа 1), наблюдалось связанное с инъекцией повышение уровня глюкозы в крови в ранние моменты времени (*т.е.* через 15, 30 и 60 минут) всякий раз в дни 1, 8, 22, 46 и 67. У животных, которым вводили изотипический контроль на день 0 и эксендин-4 в дни провокации эксендином-4 (группа 2), наблюдалось индуцированное эксендином-4 снижение уровней глюкозы в крови в каждый день выполнения провокации. Животные, которым вводили mAb36986 на день 0 и эксендин-4 на дни 1, 8, 22, 46 и 67 (группа 3), показали уровни глюкозы, сходные с уровнем, измеренным в группе 1 в каждый момент времени в каждый день выполнения провокации эксендином-4, за исключением последнего дня (день 67). Данные демонстрируют, что одна высокая доза mAb36986 может корректировать GLP1-индуцированную гипогликемию по меньшей мере в течение 46 дней у мышей. Не было различий в уровнях глюкозы в крови между группами 1 и 3 в момент времени 0 минут в каждый день выполнения провокаций. Данные показывают, что mAb36986 не вызывает гипергликемию у мышей в тестируемых условиях.

Как показано на фигуре 1, животные, которым вводили mAb37639 на день 0 и эксендин-4 на дни 1, 8, 22, 46 и 67 (группа 4), показали эффекты нормализации уровня глюкозы только на дни 1 и 8, что указывает на то, что mAb37639 имеет более короткую продолжительность действия по сравнению с mAb36986. Животные, которым вводили mAb37645 на день 0 и эксендин-4 на дни 1, 8, 22, 46 и 67 (группа 5), не проявляли эффектов нормализации уровня глюкозы. Кроме того, было показано, что mAb36986 обладает пролонгированным действием, а также корректирует GLP1-индуцированную гипогликемию, не вызывая гипергликемию у мышей.

Таблица 15: Уровни глюкозы в крови (мг/дл) во время провокаций эксендином-4, выполняемых на дни 1, 8, 22, 46 и 67 после введения антитела

Группа		1		2		3		4		5	
Антитело, дозированное на день 0		Изотипический контроль		Изотипический контроль		mAb37639		mAb37645		mAb36986	
Введение на дни 1, 8, 22, 46 и 67		Физиологический раствор		Эксендин-4		Эксендин-4		Эксендин-4		Эксендин-4	
День	Мин	Средн	SEM	Средн	SEM	Средн	SEM	Средн	SEM	Средн	SEM
1	0	192	10	199	7	215	7	216	9	214	12
	15	255	17	139****	7	233	8	195**	16	248	16
	30	254	14	126****	7	222	11	151****	11	252	17
	60	233	17	124****	9	226	8	140****	7	225	15
	120	223	15	152***	9	212	7	160**	11	218	13
8	0	212	11	206	7	214	17	204	7	196	13
	15	258	17	124****	8	223	11	182***	12	238	7
	30	246	28	114****	6	216	13	158****	17	245	10
	60	242	18	122****	9	221	11	146****	14	242	12
	120	210	19	144**	19	215	7	182	9	199	9
22	0	210	14	190	9	199	9	192	10	207	3
	15	266	19	136****	13	216*	8	149****	13	251	12
	30	252	11	117****	14	199**	16	121****	8	232	4
	60	239	19	122****	6	188*	12	139****	15	229	8
	120	208	8	146***	6	203	11	167	17	219	8
46	0	183	11	173	4	185	9	184	11	180	10
	15	245	18	126****	12	184**	15	167***	18	237	20
	30	250	19	112****	4	171***	8	138****	10	224	25
	60	227	12	124****	9	165**	7	144****	18	222	16
	120	186	11	147	12	199	12	184	11	206	10
67	0	195	15	183	12	196	17	195	16	199	12
	15	265	19	136****	18	165****	17	153****	21	210*	15
	30	262	16	123****	5	146****	19	144****	22	144****	8
	60	237	8	122****	8	149***	11	144****	24	155***	7
	120	226	8	164*	8	186	8	168*	20	190	12

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, по сравнению с группой 1

Таблица 16: Процентные различия в уровнях глюкозы в крови по сравнению с группой 1 во время провокаций эксендином-4, выполняемых на дни 1, 8, 22, 46 и 67 после введения антитела

Группа		1		2		3		4		5	
Антитело, дозированное на день 0		Изотипический контроль		Изотипический контроль		mAb37639		mAb37645		mAb36986	
Введение на дни 1, 8, 22, 46 и 67		Физиологический раствор		Эксендин-4		Эксендин-4		Эксендин-4		Эксендин-4	
День	Мин	Средн	SEM	Средн	SEM	Средн	SEM	Средн	SEM	Средн	SEM
1	0	0	5	4	4	12	4	13	5	11	6
	15	0	7	-46****	3	-9	3	-24**	6	-3	6
	30	0	6	-50****	3	-13	4	-41****	5	-1	7
	60	0	7	-47****	4	-6	5	-38****	5	-4	7
	120	0	7	-32***	4	-7	4	-26**	5	-2	6
8	0	0	5	-3	3	1	8	-4	3	-8	6

	15	0	7	-52****	3	-13	4	-30**	4	-8	3
	30	0	11	-53****	2	-12	5	-36****	7	0	4
	60	0	8	-50****	4	-9	4	-	40****	6	0
	120	0	9	-31****	9	2	3	-13	4	-5	4
22	0	0	6	-9	4	-5	4	-8	5	-1	2
	15	0	7	-49****	5	-19*	3	-	44****	5	-6
	30	0	5	-53****	6	-21*	6	-	52****	3	-8
	60	0	8	-49****	3	-21*	5	-	42****	6	-4
	120	0	4	-30****	3	-2	5	-20*	8	5	4
46	0	0	6	-19	14	1	5	1	6	-2	6
	15	0	7	-56****	8	-25	6	-32**	7	-3	8
	30	0	8	-62****	7	-32**	3	-45****	4	-10	10
	60	0	5	-53****	9	-27*	3	-36**	8	-2	7
	120	0	6	-32**	13	7	7	-1	6	11	5
67	0	0	8	-20	14	1	9	0	8	2	6
	15	0	7	-56****	9	-38**	7	-42****	8	-21	6
	30	0	6	-60****	7	-	7	-45****	9	-45****	3
	60	0	3	-56****	8	-37**	5	-39**	10	-34**	3
	120	0	4	-38**	11	-18	4	-26	9	-16	5

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, по сравнению с группой 1

ПРИМЕР 6: Влияние антитела-антагониста GLP1R на GLP1-индуцированную гипогликемию у гуманизированных GLP1R мышей.

Этот пример относится к исследованию, проведенному для определения эффективности повышения уровня глюкозы и продолжительности действия антитела-антагониста против GLP1R, mAb36986, на GLP1-индуцированную гипогликемию. Мышам, гомозиготным по экспрессии человеческого GLP1R вместо мышинного GLP1R (называемых гуманизированными GLP1R мышами), вводили mAb36986 и повторно провоцировали аналогом GLP1, эксендином-4 (Sigma, номер по каталогу E7144). Эффективность и продолжительность действия mAb36986 сравнивали с пептидным антагонистом GLP1R, эксендином (9-39) (Bachem, номер по каталогу 4017799), называемым далее в этом примере как эксендин-9.

Тридцать девять 2,5-месячных самцов гуманизированных GLP1R мышей случайным образом разделяли на одну группу из шестнадцати мышей, две группы из восьми мышей и одну группу из семи мышей. На день 0 группе из шестнадцати животных (группы 1 и 2) подкожно (s.c.) вводили изотипическое контрольное антитело hIgG4 (называемое изотипическим контролем, доза 10 мг/кг). Одной группе из восьми животных (группа 3) вводили подкожно эксендин-9 (доза 10 мг/кг), тогда как другой группе из восьми животных (группа 4) вводили подкожно (доза 3 мг/кг) mAb36986. Группе из семи животных (группа 5) вводили подкожно (доза 10 мг/кг) mAb36986. На

следующий день (день 1) животных, которым вводили изотипический контроль, случайным образом разделяли на две группы (группа 1 и 2) по восемь мышей. Через 24 часа после введения тестируемого препарата (= моменту времени 0 минут на день 1) животным в группе 1 внутрибрюшинно (i.p.) вводили физиологический раствор, тогда как животным в группе 2 вводили внутрибрюшинно эксендин-4 (доза 0,01 мг/кг). В тот же момент времени животным в группах 3, 4 и 5 вводили внутрибрюшинно эксендин-4 (доза 0,01 мг/кг). У всех животных уровень глюкозы в крови измеряли с помощью ручного глюкометра непосредственно до и через 15, 30, 60 и 120 минут после введения физиологического раствора или эксендина-4. Все животные оставались в назначенных им группах до завершения исследования на день 80. Животным в группах 1, 2, 4 и 5 провокацию эксендином-4 повторяли на дни 3, 7, 15, 21, 29, 65 и 80. Животным в группе 3 вводили еще одну дозу эксендина-9 на день 3 и заражение эксендином-4 выполняли через 0,5 и 4,5 часа после введения эксендина-9.

Для каждой провокации эксендином-4 для каждого животного рассчитывали площадь под кривой (AUC) уровней глюкозы в крови во время 120-минутной провокации. Значение AUC для каждого животного при каждой провокации нормализовали к среднему значению AUC группы 1. В таблице 17 и на фигуре 2 показано среднее значение $\pm$ SEM нормализованного значения AUC, рассчитанного для каждой группы для каждой провокации. Статистические анализы проводили с помощью двухфакторного ANOVA с последующим post-hoc анализом с помощью теста Бонферрони, сравнивающие группы 1, 3, 4 или 5 с группой 2 для каждой провокации.

По сравнению с животными, которым вводили изотипический контроль на день 0 и физиологический раствор в дни провокации эксендином-4 (группа 1), животные, которым вводили изотипический контроль на день 0 и эксендин-4 в дни заражения эксендином-4 (группа 2), показали индуцированные эксендином-4 снижения AUC нормализованной глюкозы в каждый день выполнения провокации. Животные, которым вводили эксендин-9 (группа 3), наблюдалась коррекция индуцированной эксендином-4 гипогликемии, когда провокацию эксендином-4 выполняли через 30 минут после введения эксендина-9, но не когда провокацию выполняли через 4,5 или 24 часа после введения эксендина-9. Животные, которым вводили однократную дозу 3 мг/кг mAb36986 (группа 4), показали коррекцию индуцированной эксендином-4 гипогликемии, когда провокацию эксендином-4 выполняли на дни 1, 3, 7, 15, 21 и 29 после введения mAb36986, но не тогда, когда провокацию выполняли на день 65 и 80

после введения mAb36986. Животные, которым вводили однократную дозу 10 мг/кг mAb36986 (группа 5), показали коррекцию индуцированной эксендином-4 гипогликемии, когда провокацию эксендином-4 выполняли на дни 1, 3, 7, 15, 21, 29 и 65 после введения mAb36986, но не тогда, когда провокацию выполняли на день 80 после введения mAb36986.

Данные демонстрируют, что однократная доза mAb36986 может корректировать GLP1-индуцированную гипогликемию в течение одного-двух месяцев у мышей, и что продолжительность действия зависит от дозы, тогда как однократная доза эксендина-9 корректирует GLP-1-индуцированную гипогликемию в течение 4 часов или менее. В заключение, антитело-антагонист GLP1R по настоящему изобретению, mAb36986, корректировало GLP1-индуцированную гипогликемию с длительной и дозозависимой продолжительностью действия.

Таблица 17: Площадь под кривой (AUC) нормализованной глюкозы во время провокаций эксендином-4, выполненных через часы (ч) или дни (д) после введения тестируемого препарата

Группа	Тестируемый препарат, вводимый на день 0	Соединение, вводимое в момент времени 0 мин провокации эксендином-4	Время провокации эксендином-4 после введения тестируемого препарата	AUC нормализованной глюкозы во время провокации эксендином-4 (% от группы 1)	
				Среднее	SEM
1	Изотипический контроль	Физиологический раствор	1д (=24ч)	100,0****	4,4
			3д	100,0****	2,6
			7д	100,0****	2,5
			15д	100,0****	3,0
			21д	100,0****	1,2
			29д	100,0****	2,6
			65д	100,0****	4,6
			80д	100,0****	4,9
2	Изотипический контроль	Эксендин-4	1д (=24ч)	62,7	3,7
			3д	69,5	4,3
			7д	64,2	2,9
			15д	65,1	2,9
			21д	69,2	7,0
			29д	62,8	3,2
			65д	62,3	2,8
			80д	62,9	5,9
3	Эксендин-9	Эксендин-4	0.5ч	101,3****	4,4
			4.5ч	70,1	2,3
			24ч	74,1	5,8
4	mAb36986 (3 мг/кг)	Эксендин-4	1д (=24ч)	96,5****	2,6
			3д	108,7****	3,7
			7д	108,6****	2,9
			15д	102,2****	4,3
			21д	93,2***	3,1
			29д	84,0***	3,4

			65д	67,4	2,6
			80д	70,4	5,7
5	mAb36986 (10 мг/кг)	Эксендин-4	1д (=24ч)	106,7****	5,4
			3д	116,6****	5,3
			7д	107,7****	1,6
			15д	107,5****	2,9
			21д	108,7****	2,9
			29д	103,5****	4,5
			65д	95,8****	3,8
			80д	74,2	3,1

Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации в дополнение к тем, которые описаны в настоящем документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и прилагаемых фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком рецептора глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1R), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ослабляет активность GLP1R и повышает уровни глюкозы в крови.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело обладает одним или несколькими свойствами, выбранными из группы, состоящей из следующего:

- (a) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело;
- (b) связывается с человеческим GLP1R при 25°C с константой диссоциации (K_D) менее 6 нМ согласно измерениям в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR);
- (c) связывается с человеческим GLP1R при 37°C с K_D менее 20 нМ согласно измерениям в анализе SPR;
- (d) связывается с мономерным GLP1R яванского макака при 25°C с K_D менее 20 нМ согласно измерениям в анализе SPR;
- (e) связывается с мономерным GLP1R яванского макака при 37°C с K_D менее 60 нМ согласно измерениям в анализе SPR;
- (f) связывается с мономерным мышинным GLP1R при 25°C с K_D менее 22 нМ согласно измерениям в анализе SPR;
- (g) связывается с мономерным мышинным GLP1R при 37°C с K_D менее 75 нМ согласно измерениям в анализе SPR;
- (h) блокирует взаимодействие GLP1 и GLP1R со значением IC_{50} менее чем примерно 10 нМ согласно измерениями в *in vitro* анализе связывания рецептор/лиганд при 37°C;
- (i) уменьшает GLP1-индуцированную гипогликемию без вызывания гипергликемии; и
- (j) повышает уровень глюкозы в крови до нормализованного уровня и поддерживает повышенный уровень в течение до 2 месяцев без вызывания гипергликемии.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит изотип IgG1 или IgG4.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR); и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), где:

HCVR содержит:

- (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 22 или 40;
- (ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 22 или 40;
- (iii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 22 или 40; или
- (iv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 22 или 40, содержащую не более 12 аминокислотных замен; и

LCVR содержит:

- (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 30 или 48;
- (ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, 30 или 48;
- (iii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, 30 или 48; или
- (iv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 30 или 48, содержащую не более 12 аминокислотных замен.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, содержащее парную аминокислотную последовательность HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 22/30 и 40/48.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, где:
- (a) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 24 или 42;
 - (b) HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 26 или 44;
 - (c) HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 28 или 46;
 - (d) LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, 32 или 50;
 - (e) LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или 52; и
 - (f) LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 34 или 54.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, содержащее HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4/6/8/12/14/16, 24/26/28/32/14/34 или 42/44/46/50/52/54.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, содержащее тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), где HC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 36 и 56.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, содержащее HC и LC, где LC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 38 и 58.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, содержащее HC и LC, где HC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 36 и 56; и LC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 38 и 58.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-11, содержащее HC/LC, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18/20, 36/38 или 56/58.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует за связывание с GLP1R с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-12.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с GLP1R по любому из пп. 1-12, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

16. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR и/или LCVR антитела по любому из пп. 5-12.

17. Выделенный вектор, содержащий полинуклеотидную молекулу по п. 16.

18. Выделенная клетка-хозяин, экспрессирующая вектор по п. 17.

19. Выделенная клетка-хозяин по п. 18, экспрессирующая первый вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела по любому из пп. 5-12, и второй вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела по любому из пп. 5-12.

20. Способ получения антитела-антагониста против GLP1R или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий выращивание клетки-хозяина по п. 18 или 19 в условиях, которые обеспечивают возможность продуцирования антитела или фрагмента, и выделение полученного таким образом антитела или фрагмента.

21. Способ по п. 20, дополнительно включающий составление антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в виде фармацевтической композиции, содержащей приемлемый носитель.

22. Способ лечения, предупреждения или ослабления по меньшей мере одного симптома или признака заболевания или нарушения, связанного с GLP1R, при этом способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-12 нуждающемуся в этом субъекту.

23. Способ по п. 22, в котором заболевание или нарушение, связанное с GLP1R, представляет собой гипогликемию.

24. Способ по п. 23, в котором гипогликемия представляет собой постбариатрическую гипогликемию.

25. Способ по любому из пп. 22-24, в котором фармацевтическую композицию вводят субъекту после операции на верхней части желудка.

26. Способ по любому из пп. 22-25, в котором фармацевтическую композицию вводят профилактически или терапевтически нуждающемуся в этом субъекту.

27. Способ по любому из пп. 22-26, в котором фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутривнутрибрюшинно или внутримышечно.

28. Способ повышения уровня глюкозы в крови, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела-антагониста против GLP1R или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-12 нуждающемуся в этом субъекту.

29. Способ по п. 28, в котором субъект имеет заболевание или нарушение, связанное с GLP1R.

30. Способ по п. 29, в котором заболевание или нарушение, связанное с GLP1R, представляет собой гипогликемию.

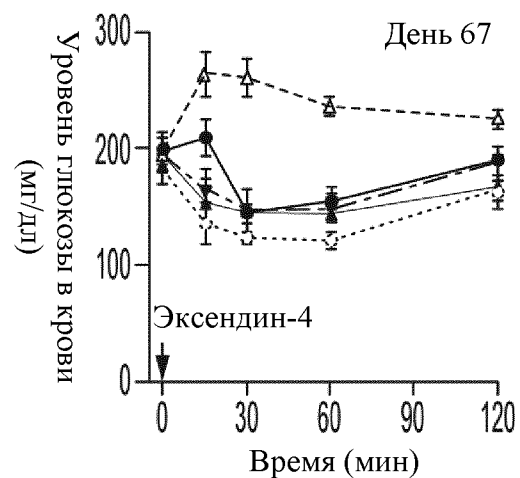
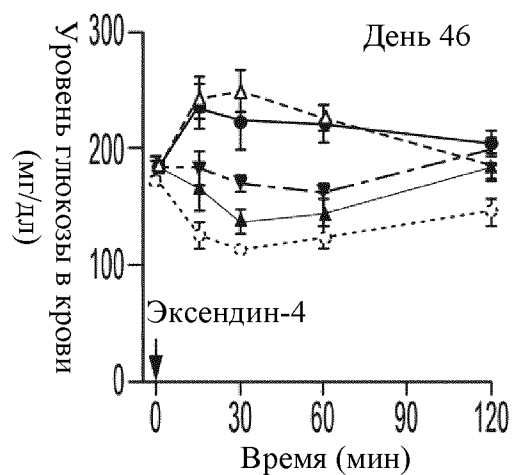
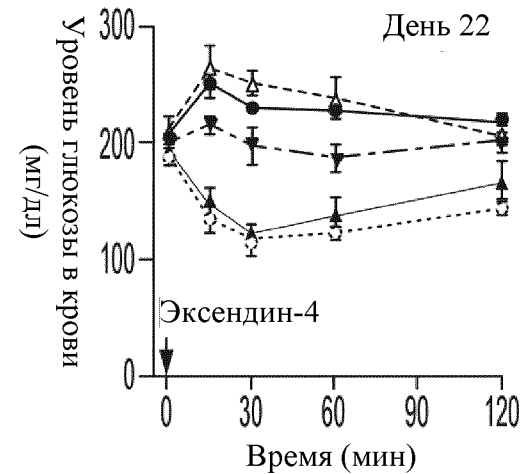
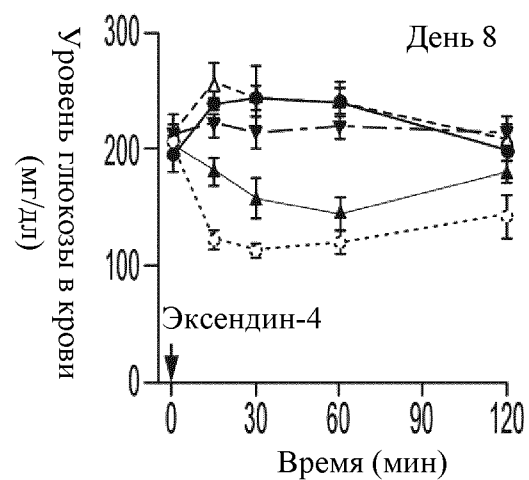
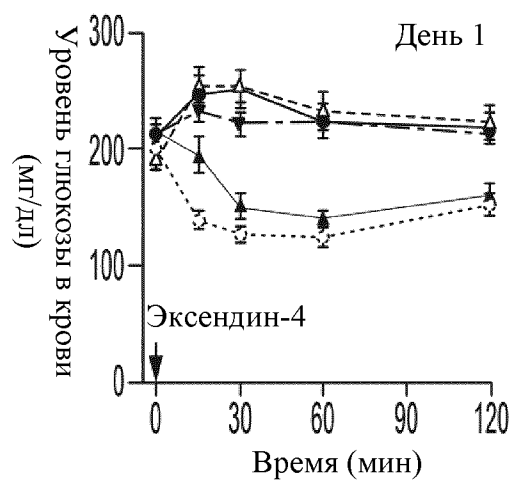
31. Способ по п. 30, в котором гипогликемия представляет собой постбариатрическую гипогликемию.

32. Способ по любому из пп. 28-31, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту после операции на верхней части желудка.

33. Способ по любому из пп. 28-32, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят профилактически или терапевтически нуждающемуся в этом субъекту.

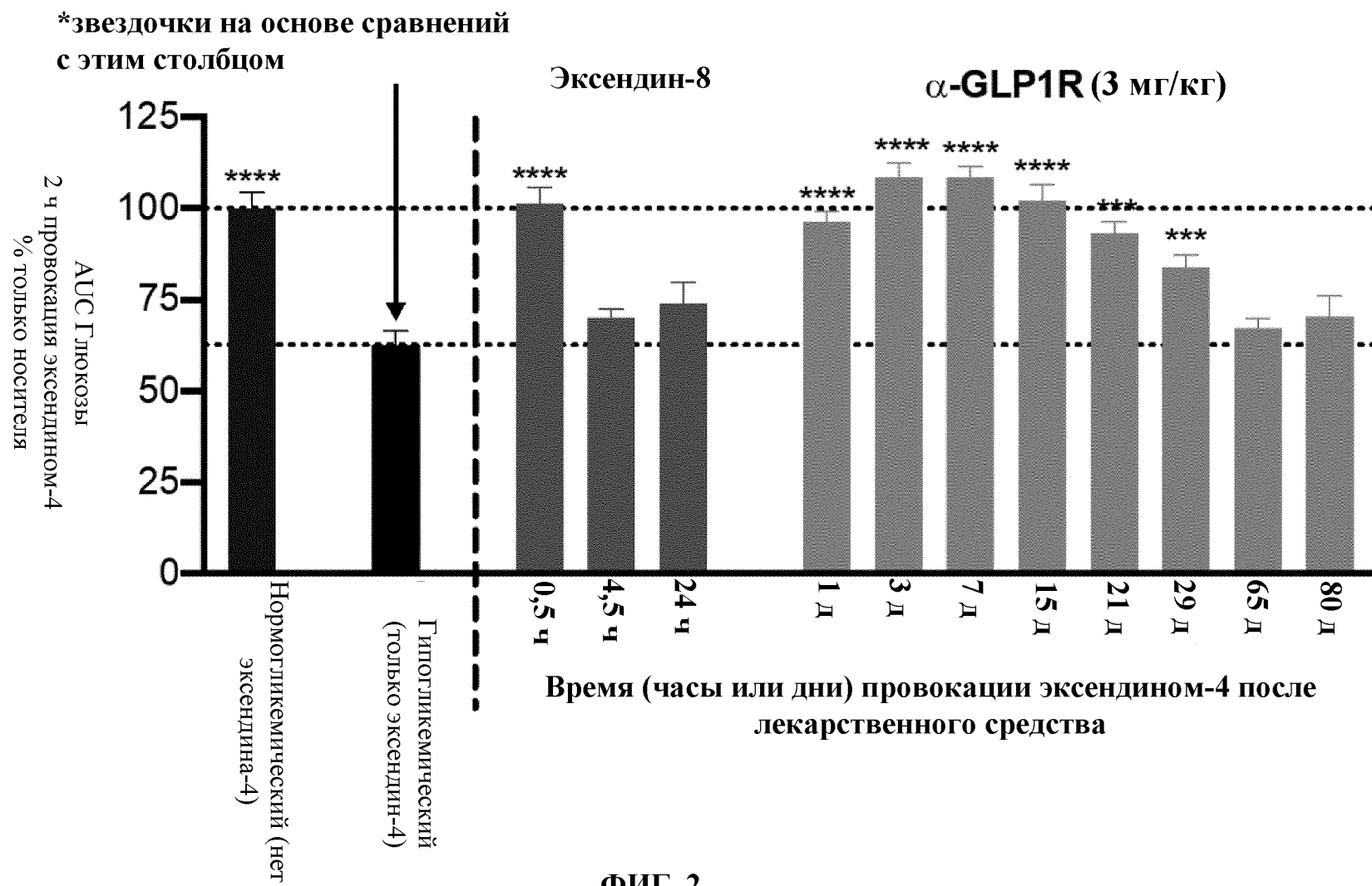
34. Способ по любому из пп. 28-33, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутрибрюшинно или внутримышечно.

35. Способ по любому из пп. 28-34, в котором уровень глюкозы в крови субъекта повышают до нормализованного уровня.



- △- Изотипич. контроль + Физиол. р-р
- Изотипич. Контроль + Эксендин-4
- ▽- H2aM37639N + Эксендин-4
- ▲- H2aM37645N + Эксендин-4
- H2aM36986N + Эксендин-4

ФИГ. 1



ФИГ. 2