

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391776** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.08.03

(51) Int. Cl. *C07K 16/42* (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.17

(54) **ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЕ БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С АГОНИСТАМИ NPR1**

(31) **63/127,959**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.12.18**

**Данн Майкл, Мортон Лори, Шталь
Нейл, Хуан Тэмми, Чаттерджи Ишита,
Камат Вишал, Рафик Ашик (US)**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/064073**

(87) **WO 2022/133239 2022.06.23**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

Медведев В.Н. (RU)

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) Изобретение относится к новым иммуноглобулиновым белкам, связывающимся с агонистом рецептора 1 натрийуретического пептида (NPR1) человека, предпочтительно, антителом против NPR1. В некоторых вариантах осуществления белки по изобретению содержат по меньшей мере один иммуноглобулиновый вариабельный домен, связывающийся с антителом против NPR1. В некоторых вариантах осуществления белки по изобретению можно использовать в блокировании и/или реверсировании эффекта вводимого антитела против NPR1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки можно использовать для эффективной регуляции артериального давления и гемодинамики у людей.

A1

202391776

202391776

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578420EA/022

ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЕ БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С АГОНИСТАМИ NPR1

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[001] Настоящее изобретение относится к иммуноглобулиновым белкам, специфически связывающимся с агонистами рецептора 1 натрийуретического пептида (NPR1), и терапевтическим способам с использованием этих белков.

ПРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[002] Настоящая заявка подана 17 декабря 2021 года в виде международной патентной заявки РСТ. По настоящей заявке испрашивается приоритет по временной патентной заявке США № 63/127959, поданной 18 декабря 2020 года, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ

[003] Настоящая заявка содержит список последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и включенный, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 13 декабря 2021 года, названа 40848-0104WOU1-SeqListing.txt и имеет размер 71 килобайт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[004] Рецептор 1 натрийуретического пептида (NPR1; также известный как NPR-A) принадлежит к семейству поверхностных рецепторов гуанилилциклазы, ферментов, катализирующих превращение ГТФ в циклический ГМФ. NPR1 высоко экспрессируется в почках, легких, надпочечниках, сосудистой системе, головном мозге, печени, эндотелии и жировых тканях и на более низких уровнях в сердце. Он активируется посредством связывания с предсердным натрийуретическим пептидом (ANP) или натрийуретическим пептидом головного мозга (BNP). Активация и передача сигнала NPR1 стимулируют многие физиологические ответы, включающие многие ткани. Система ANP-NPR1 хорошо изучена из-за своей роли в вазорелаксации, натрийурезе, диурезе, проницаемости эндотелия и несердечно-сосудистых функциях, подобных липолизу и функциям иммунных клеток (Potter 2011, Pharmacol. Ther. 130: 71-82). Активация NPR1 приводит к натрийурезу (экскреции соли почками) и снижает артериальное давление.

[005] Одобренные в настоящее время терапевтические средства предназначены для агонизма NPR1, вызывающего множество клинических проблем.

[006] Моноклональные антитела против NPR1 впервые описаны Kitano, et al., (1995 Immunol Lett 47: 215-22). Активационные или агонистические антитела против NPR1 описаны, например, в патенте США/публикации № 9090695 и 20160168251 и в WO2010065293. Полностью человеческие агонистические антитела, специфически связывающиеся с белком NPR1 с высокой аффинностью и активирующие его, описаны в публикации США № 20200123263. R5381 является агонистом NPR1, который имеет

показанную большую длительность эффекта снижения системного артериального давления по сравнению с существующими стандартами лечения.

[007] Исследования *in vivo* показали, что R5381 индуцировал значительное и постоянное снижение системного артериального давления без признаков неблагоприятной гипотензии (т.е. синкопе, измененной локомоции, смерти). Т.к. обнаружено, что первичным механизмом действия некоторых антител против NPR1 является гемодинамический, существует потребность в средстве обратного действия для предотвращения их гемодинамических эффектов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[008] Для решения возможных проблем, связанных с использованием агонистов NPR1 (например, активирующего или агонистического антитела против NPR1), разрабатывали средства обратного действия, специфически связывающиеся с такими агонистами NPR1, как представлено в настоящем описании.

[009] Описаны антитела против NPR1 для лечения и/или профилактики заболевания, нарушения или состояния, ассоциированного с NPR1, и/или улучшения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием (см., например, WO2020/086406). Первичным механизмом действия антитела против NPR1 является гемодинамический. Потенциальные нежелательные явления, ассоциированные с пониженным артериальным давлением, могут включать персистирующую, симптоматическую гипотензию, рефлекторную тахикардию при компенсаторных ответах симпатической нервной системы (вероятно, повышая риск инфаркта миокарда, инсульта, аритмий, сердечной недостаточности) и сниженный минутный объем кровообращения и перфузию ишемически пораженных органов у индивидуумов с нормальным (низким) венозным давлением. Таким образом, существует потребность в средстве обратного действия (или резервном средстве), которое может направленно воздействовать и стабилизировать, или снижать, или реверсировать гемодинамические эффекты антитела против NPR1.

[010] Таким образом, настоящее изобретение относится к средству, реверсирующему гемодинамические эффекты агониста рецептора 1 натрийуретический пептид (NPR1). Средство также обозначают в настоящем описании как средство обратного действия или резервное средство.

[011] В другом аспекте настоящее изобретение относится к средству, реверсирующему снижение артериального давления, ассоциированное с введением агониста NPR1, у индивидуума.

[012] В одном из вариантов осуществления средство выбрано из группы, состоящей из иммуноглобулиновый белок, вазопрессора, агониста альфа-адренорецептора, стероида, антидиуретического гормона, ингибитора ангиогенеза и низкомолекулярного средства, повышающего артериальное давление.

[013] В одном из вариантов осуществления средство является иммуноглобулиновым белком. В одном из вариантов осуществления средство

специфически связывается с агонистом NPR1. В одном из вариантов осуществления агонист NPR1 является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с NPR1. В одном из вариантов осуществления антитело против NPR1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей SEQ ID NO: 48; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей SEQ ID NO: 52. В одном из вариантов осуществления антитело против NPR1 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащие SEQ ID NO: 49, 50 и 51, соответственно; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащие SEQ ID NO: 53, 54 и 55, соответственно. В одном из вариантов осуществления антитело против NPR1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR SEQ ID NO: 48 и LCVR SEQ ID NO: 52. В одном из вариантов осуществления антитело против NPR1 является моноклональным антителом. В одном из вариантов осуществления антитело против NPR1 является антителом IgG1 или IgG4. В одном из вариантов осуществления антитело против NPR1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 56, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 57. В одном из вариантов осуществления антитело против NPR1 является R5381.

[014] В одном из вариантов осуществления резервное средство является иммуноглобулиновым белком. В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок содержит моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В другом варианте осуществления иммуноглобулиновый белок содержит бивалентное антитело. В другом варианте осуществления иммуноглобулиновый белок содержит моновалентное или "одноплечевое" антитело. В другом варианте осуществления иммуноглобулиновый белок содержит рекомбинантное моноклональное антитело. В другом варианте осуществления иммуноглобулиновый белок содержит полностью человеческое моноклональное антитело, являющееся бивалентным или моновалентным. В другом варианте осуществления иммуноглобулиновый белок является полностью человеческим моноклональным антителом, принадлежащим изотипу IgG1 или IgG4. В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок содержит Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновый белок содержит моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, бивалентное моноклональное антитело, моновалентное моноклональное антитело, Fab-фрагмент, F(ab)₂-фрагмент, Fv-фрагмент, Fd-фрагмент, scFv или dAb. В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок содержит по меньшей мере один иммуноглобулиновый вариабельный домен, содержащий 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).

В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок содержит один иммуноглобулиновый переменный домен, содержащий три CDR тяжелой цепи, содержащиеся в HCVR, и три CDR легкой цепи, содержащиеся в LCVR. В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок дополнительно содержит мультимеризационный компонент, где мультимеризационный компонент содержит по меньшей мере один Fc-фрагмент. В одном из вариантов осуществления мультимеризационный компонент содержит первый Fc-фрагмент и второй Fc-фрагмент, где первый Fc-фрагмент или второй Fc-фрагмент, но не оба, содержит модификацию в домене СН3, снижающую связывание иммуноглобулинового белка с протеином А по сравнению с иммуноглобулиновым белком, в котором отсутствует модификация. В одном из вариантов осуществления модификация содержит замену Н315R и замену Y316F (нумерацию EU).

[015] В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок содержит моновалентное антитело, где моновалентное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую константную область тяжелой цепи и HCVR, и легкую цепь, содержащую константную область легкой цепи и LCVR, где тяжелая цепь принадлежит изотипу IgG1 или IgG4 человека. В одном из вариантов осуществления константная область тяжелой цепи содержит модификацию в домене СН3, снижающую связывание иммуноглобулинового белка с протеином А по сравнению с иммуноглобулиновым белком, в котором отсутствует модификация. В одном из вариантов осуществления модификация содержит замену Н315R и замену Y316F (нумерация EU). В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок дополнительно содержит мультимеризационный компонент, где мультимеризационный компонент содержит Fc-фрагмент. В одном из вариантов осуществления Fc-фрагмент принадлежит изотипу IgG1 или IgG4 человека.

[016] В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок содержит Fab-фрагмент, содержащий один иммуноглобулиновый переменный домен, содержащий три CDR тяжелой цепи, содержащиеся в HCVR, и три CDR легкой цепи, содержащиеся в LCVR. В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок дополнительно содержит мультимеризационный компонент. В одном из вариантов осуществления мультимеризационный компонент содержит по меньшей мере один Fc-фрагмент. В одном из вариантов осуществления Fc-фрагмент принадлежит изотипу IgG1, IgG4 или его варианту. В одном из вариантов осуществления мультимеризационный компонент содержит первый Fc-фрагмент и второй Fc-фрагмент, где первый Fc-фрагмент или второй Fc-фрагмент, но не оба, содержит модификацию в домене СН3, снижающую связывание иммуноглобулинового белка с протеином А по сравнению с иммуноглобулиновым белком, в котором отсутствует модификация. В одном из вариантов осуществления модификация содержит замену Н315R и замену Y316F (нумерация EU) в Fc-фрагменте изотипа IgG1 или IgG4.

[017] В таблице 1 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) примеров иммуноглобулиновых белков. В таблице 2 приведены идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 примеров иммуноглобулиновых белков.

[018] Примеры условий, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение по AbM. В общих терминах, определение по Kabat основано на изменчивости последовательности, определение по Chothia основано на локализации структурных петлевых областей, и определение по AbM представляет собой компромисс между подходами Kabat и Chothia. 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); и Martin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Также доступны общедоступные базы данных для идентификации последовательностей CDR в антителе.

[019] В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению являются антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, содержащими HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, имеющую не более двенадцати замен аминокислот, и/или где указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, имеющую не более десяти замен аминокислот. Например, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, где указанная аминокислотная последовательность имеет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать замен аминокислот. В другом примере, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, где указанная аминокислотная последовательность имеет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен аминокислот. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к иммуноглобулиновым белкам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, где указанная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере одну замену аминокислоты, и/или где указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице

1, где указанная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере одну замену аминокислоты.

[020] В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению являются антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, содержащими HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, или в значительной степени схожей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности в отношении них.

[021] В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению являются антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, содержащими LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1, или в значительной степени схожей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности в отношении них.

[022] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых из аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в таблице 1, или в значительной степени схожей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[023] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых из аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в таблице 1, или в значительной степени схожей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[024] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в таблице 1, или в значительной степени схожей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[025] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых из

аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в таблице 1, или в значительной степени схожей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[026] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых из аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в таблице 1, или в значительной степени схожей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[027] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в таблице 1, или в значительной степени схожей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

[028] В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению являются антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, содержащими пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любые из аминокислотных последовательности HCDR3, приведенных в таблице 1, спаренные с любыми из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любых из примеров иммуноглобулиновых белков, приведенных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16 и 28/36.

[029] В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению являются антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, кодируемыми молекулами нуклеиновой кислоты, представленными в настоящем описании. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любые из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, приведенных в таблице 2, или в значительной степени схожей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности в отношении них.

[035] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любые аминокислотные последовательности LCDR2, приведенные в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, приведенных в таблице 2, или в значительной степени схожей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности в отношении них.

[036] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любые из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, приведенных в таблице 2, или в значительной степени схожей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности в отношении них.

[037] В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению являются антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, имеющим модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления можно использовать модификацию для удаления нежелательных участков гликозилирования или антитело, в котором отсутствует остаток фукозы, присутствующий на олигосахаридной цепи, например, для повышения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield, et al., (2002) JBC 277:26733). При другом использовании модификацию галактозилирования можно осуществлять для модификации обусловленной компонентом цитотоксичности (CDC).

[038] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к иммуноглобулиновому белку, содержащему: (i) один иммуноглобулиновый вариабельный домен, содержащий три тяжелой цепи CDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, и три легкой цепи CDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащийся в LCVR. В одном из вариантов осуществления HCVR иммуноглобулинового белка содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любых из последовательностей HCVR в таблице 1. В одном из вариантов осуществления LCVR иммуноглобулинового белка содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любых из последовательностей LCVR в таблице 1. В одном из вариантов осуществления HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22; и LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30. В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 24; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 26; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 28; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 32; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 34; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 36. В одном из вариантов осуществления HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, выбранные из (i) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и 16; или (ii) SEQ ID NO: 24, 26, 28, 32, 34 и 36. В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок дополнительно содержит мультимеризационный компонент, где мультимеризационный компонент содержит по меньшей мере один Fc-фрагмент. В одном из вариантов осуществления Fc-фрагмент принадлежит изотипу IgG1 или IgG4. В одном из вариантов осуществления мультимеризационный компонент содержит первый Fc-фрагмент и второй Fc-фрагмент, где первый Fc-фрагмент или второй Fc-фрагмент, но не оба, содержит модификацию в домене СН3, снижающую связывание иммуноглобулинового белка с протеином А по сравнению с иммуноглобулиновым белком, в котором отсутствует модификация. В одном из вариантов осуществления модификация содержит замену Н315R и замену Y316F (нумерация EU) в Fc-фрагменте изотипа IgG1 или IgG4. В одном из вариантов осуществления мультимеризационный компонент содержит Fc-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и Fc-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

SEQ ID NO: 58:

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS
IEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

[039] В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок содержит бивалентное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок содержит моновалентное ("одноплечевое") антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок содержит тяжелую цепь, содержащую HCVR, и легкую цепь, содержащую LCVR, где тяжелая цепь принадлежит изотипу IgG1 или IgG4 человека. В одном из вариантов осуществления тяжелая цепь содержит модификацию в домене СН3, снижающую связывание иммуноглобулинового белка с протеином А по сравнению с иммуноглобулиновым белком, в котором отсутствует модификация. В одном из вариантов осуществления модификация содержит замену Н315R и замену Y316F (нумерация EU) в тяжелой цепи изотипа IgG1 или IgG4. В одном из вариантов осуществления тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID

NO: 18 и 38; и легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 40. В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок дополнительно содержит Fc-фрагмент. В одном из вариантов осуществления Fc-фрагмент принадлежит изотипу IgG1 или IgG4. В одном из вариантов осуществления Fc-фрагмент содержит аминокислотную последовательность содержащий SEQ ID NO: 46.

[040] В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок специфически связывается с антителом против NPR1. В одном из вариантов осуществления антитело против NPR1 является R5381.

[041] В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок является REGN9035. В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновый белок является REGN9037.

[042] В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к выделенной полинуклеотидной молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) иммуноглобулинового белка, представленного в настоящем описании. В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной полинуклеотидной молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи (LCVR) иммуноглобулинового белка, представленного в настоящем описании. В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотидную молекулу, представленную в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления вектор является рекомбинантным экспрессирующим вектором, способным экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулинового белка. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащие любые из молекул нуклеиновой кислоты, представленных в настоящем описании, т.е. молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любые из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, приведенных в таблице 2. В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, экспрессирующему вектор, представленный в настоящем описании. Например, настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей первый рекомбинантный экспрессирующий вектор, способный экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулинового белка; и второй экспрессирующий вектор, способный экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область легкой цепи иммуноглобулинового белка, как представлено в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей первую выделенную полинуклеотидную молекулу, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) иммуноглобулинового белка, представленного в настоящем описании, и вторую выделенную полинуклеотидную молекулу, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую

вариабельную область легкой цепи (LCVR) иммуноглобулинового белка, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит клетку млекопитающего или прокариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является клеткой китайского хомяка (CHO) или клеткой *Escherichia coli* (*E. coli*).

[043] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения иммуноглобулинового белка или его фрагмента, специфически связывающегося с антителом против NPR1 или его антигенсвязывающим фрагментом, включающему выращивание клетки-хозяина, представленной в настоящем описании, в условиях, делающих возможной продукцию антитела или фрагмента, и выделения продуцируемого таким образом иммуноглобулинового белка или фрагмента. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам получения иммуноглобулинового белка или его фрагмента по изобретению, включающим встраивание в клетку-хозяина экспрессирующего вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HCVR и/или LCVR иммуноглобулинового белка или его фрагмента по изобретению, функционально связанную с промотором; культивирование клетки-хозяина в условиях, способствующих экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты; и выделение иммуноглобулинового белка или его фрагмента из среды для культивирования и/или клетки-хозяина. Выделенный иммуноглобулиновый белок или его фрагмент можно очищать любыми из способов, известных в этой области. В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению можно очищать с использованием реагентов и способов, в которых используют дифференциальное связывание с протеином А, как представлено где-либо в настоящем описании.

[044] В одном из вариантов осуществления резервное средство является вазопрессором. В другом варианте осуществления вазопрессор является мидодринном.

[045] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей резервное средство, представленное в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель или дилуэнт. В одном из вариантов осуществления композиция содержит комбинацию резервного средства и второго терапевтического средства. В одном из вариантов осуществления второе терапевтическое средство является любым средством, преимущественно комбинируемым с резервным средством. Дополнительные способы комбинированного лечения и совместные составы, включающие резервные средства по изобретению, представлены где-либо в настоящем описании.

[046] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу реверсирования гемодинамических эффектов агонистического антитела или антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающегося с белком рецептора 1 натрийуретического пептида (NPR1), включающему введение фармацевтической

композиции, содержащей терапевтически эффективное количество резервного средства, представленного в настоящем описании, нуждающемуся в этом индивидууму.

[047] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу реверсирования снижения артериального давления, ассоциированного с введением агонистического антитела или антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающегося с белком рецептора 1 натрийуретического пептида (NPR1), включающему введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество резервного средства, представленного в настоящем описании, нуждающемуся в этом индивидууму.

[048] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят индивидууму подкожно, внутривенно, внутрикочно, интраперитонеально, внутримышечно или перорально.

[049] В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению резервного средства, представленного в настоящем описании, в производстве лекарственного средства для реверсирования гемодинамических эффектов, ассоциированных с введением антитела против NPR1, у нуждающегося в этом индивидуума.

[050] В одном из вариантов осуществления индивидуум имеет NPR1-ассоциированное заболевание или нарушение. В одном из вариантов осуществления заболевание или нарушение является гипертензией, сердечной недостаточностью и/или хроническим заболеванием почек.

[051] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к композиции, содержащей: (i) иммуноглобулиновый белок, как представлено в настоящем описании; и (ii) и агонист NPR1. В одном из вариантов осуществления агонист NPR1 является антителом против NPR1 (например, R5381). В одном из вариантов осуществления композицию используют в способе для эффективной регуляции артериального давления у нуждающегося в этом индивидуума. В одном из вариантов осуществления индивидуум имеет NPR1-ассоциированное заболевание или нарушение. В одном из вариантов осуществления заболевание или нарушение является гипертензией, сердечной недостаточностью и/или хронической почечной недостаточностью.

[052] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, конкурирующему за связывание с иммуноглобулиновым белком, представленным в настоящем описании.

[053] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с тем же эпитопом, что и иммуноглобулиновый белок, представленный в настоящем описании.

[054] Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора следующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[055] На фигуре 1 в форме столбиковой диаграммы представлено сравнение диссоциативного времени полувыведения ($t_{1/2}$) антител против R5381 REGN9035 и REGN9037 в буферах с pH 7,4, pH 6,5, pH 6,0 и pH 5,0.

[056] На фигуре 2 в форме линейного графика представлены фармакокинетические профили антител против R5381 REGN9035, REGN9037, REGN6580 и REGN6581 у мышей NPR1^{hu/hu}.

[057] На фигуре 3 в форме линейного графика представлены эффекты бивалентных mAb против R5381 в отношении реверсирования R5381-индуцированного снижения систолического артериального давления у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг R5381 или PBS, как показано в таблице 18. Затем животных подвергали одну внутривенную инъекцию 50 мг/кг бивалентного mAb против R5381 или PBS, как показано в таблице 18. Все значения представляют собой среднее давление за 24 часа для дней -2-20±SEM, n=4-5 на группу. Статистический анализ - двухсторонний ANOVA с критерием Даннета; *p<0,05 относительно mAb изотипического контроля.

[058] На фигуре 4 в форме линейного графика показаны эффекты бивалентных mAb против R5381 в отношении реверсирования R5381-индуцированного снижения диастолического артериального давления у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг R5381 или PBS, как показано в таблице 18. Затем животных подвергали одной внутривенной инъекции 50 мг/кг бивалентного mAb против R5381 или PBS, как показано в таблице 18. Все значения представляют собой среднее давление за 24 часа для дней -2-20±SEM, n=4-5 на группу. Статистический анализ - двухсторонний ANOVA с критерием Даннета; *p<0,05 относительно mAb изотипического контроля.

[059] На фигуре 5 в форме линейного графика показаны эффекты бивалентных mAb против R5381 в отношении реверсирования mAb R5381-индуцированных эффектов в отношении частоты сердечных сокращений у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг R5381 или PBS, как показано в таблице 18. Затем животных подвергали одной внутривенной инъекции 50 мг/кг бивалентного mAb против R5381 или PBS, как показано в таблице 18. Все значения представляют собой средние частоты сердечных сокращений за 24 часа для дней -2-20±SEM, n=4-5 на группу. Статистический анализ - двухсторонний ANOVA с критерием Даннета.

[060] На фигуре 6 в форме линейного графика показаны эффекты бивалентных mAb против R5381 в отношении реверсирования mAb R5381-индуцированного снижения

среднего артериального давления у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг R5381 или PBS, как показано в таблице 18. Затем животных подвергали одной внутривенной инъекции 50 мг/кг бивалентного mAb против R5381 или PBS, как показано в таблице 18. Все значения представляют собой среднее давление за 24 часа для дней $-2-20 \pm \text{SEM}$, $n=4-5$ на группу. Статистический анализ - двухсторонний ANOVA с критерием Даннета; $*p < 0,05$ относительно mAb изотипического контроля.

[061] На фигуре 7 в форме линейного графика показаны эффекты бивалентных mAb против R5381 в отношении реверсирования R5381-индуцированного снижения систолического артериального давления у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг R5381 или PBS, как показано в таблице 23. Затем животных подвергали одной подкожной инъекции 50 мг/кг бивалентного mAb против R5381 или mAb изотипического контроля, как показано в таблице 23. Все значения представляют собой среднее давление за 24 часа для дней $-3-21 \pm \text{SEM}$, $n=4-5$ на группу. Статистический анализ - двухсторонний ANOVA с критерием Даннета; $*p < 0,05$ PBS относительно mAb изотипического контроля; $**p < 0,01$ PBS относительно mAb изотипического контроля; $!p < 0,05$ REGN6580 относительно mAb изотипического контроля; $\#p < 0,05$ REGN6581 относительно изотипического контроля.

[062] На фигуре 8 в форме линейного графика показаны эффекты моновалентных mAb против R5381 в отношении реверсирования R5381-индуцированного систолического артериального давления у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} рандомизировали в группы с учетом массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг агонистического mAb против NPR1 или mAb изотипического контроля, как показано в таблице 28. Затем животных подвергали одной внутривенной инъекции 50 мг/кг бивалентного mAb против R5381 (REGN6580), или моновалентного mAb против R5381 (REGN9035 или REGN9037), или PBS, как показано в таблице 28. Все значения представляют собой среднее $\pm \text{SEM}$, $n=4-5$ на группу. Статистический анализ - двухсторонний ANOVA с критерием Даннета; $*p < 0,05$ REGN6580 s.c. относительно mAb изотипического контроля; $\#p < 0,05$ REGN9035 s.c. относительно mAb изотипического контроля; $!p < 0,05$ REGN9037 s.c. относительно mAb изотипического контроля; $@p < 0,05$ REGN6580 i.v. относительно mAb изотипического контроля; $\&p < 0,05$ REGN9035 i.v. относительно mAb изотипического контроля; $\>p < 0,05$ REGN9037 i.v. относительно mAb изотипического контроля.

[063] На фигуре 9 в форме линейного графика показаны острые эффекты моновалентных и бивалентных mAb против R5381 в отношении реверсирования R5381-индуцированного снижения артериального давления у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} рандомизировали в

группы с учетом массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг R5381 или контроля PBS, как показано в таблице 28. Затем животных подвергали одной внутривенной инъекции 50 мг/кг бивалентного mAb против R5381 (REGN6580), или моновалентного mAb против R5381 (REGN9035 или REGN9037), или mAb изотипического контроля, как показано в таблице 28. Все значения представляют собой среднее±SEM, n=4-5 на группу.

[064] На фигуре 10 в форме линейного графика показаны эффекты моновалентных mAb против R5381 в отношении реверсирования R5381-индуцированного образования цГМФ у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} рандомизировали в группы с учетом массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг агонистического mAb против NPR1 или mAb изотипического контроля, как показано в таблице 28. Затем животных подвергали одной внутривенной инъекции 50 мг/кг бивалентного mAb против R5381 (REGN6580), или моновалентного mAb против R5381 (REGN9035 или REGN9037), или PBS, как показано в таблице 28. Мочу собирали в течение ночи со дня исследования 21 до 22. Все значения представляют собой среднее±SEM, n=5-6 на группу. Статистический анализ - ANOVA с критерием Даннета; ****p<0,0001 относительно PBS+PBS; ##### p<0,0001 относительно R5381+mAb изотипического контроля.

[065] На фигуре 11 показано, что три дозы 2,5 мг/кг мидодрина, вводимые через три дня после однократной дозы 25 мг/кг R5381, реверсировали эффекты снижения артериального давления R5381. Самцам яванского макака массой от 3 до 5 кг хирургически имплантировали радиотелеметрический передатчик. В день 0 каждому животному вводили однократный IV болюс физиологического раствора (PBS; n=10) или 25 мг/кг R5381 (n=13). В день 3 каждому животному вводили 3 дозы 2,5 мг/кг/дозу мидодрина (n=6 в группе физиологического раствора; n=7 в группе R5381) или воду/носитель (n=4 в группе физиологического раствора; n=6 в группе R5381), вводимые посредством желудочного зонда с интервалами между дозами от 3 до 4 часов, что указано пунктирными линиями на оси x. Измерения артериального давления собирали для каждого животного перед введением дозы (для исходных измерений) и во время 4-дневного периода мониторинга после введения дозы. Показаны средние изменения относительно исходного систолического артериального давления для каждой исследуемой группы между 35 и 72 часами после введения дозы R5381. Данные выражают как среднее для группы±стандартная ошибка среднего.

[066] На фигуре 12 показано, что три дозы 2,5 мг/кг мидодрина, вводимые через 3 дня после однократной дозы 25 мг/кг, реверсировали R5381-индуцированные эффекты в отношении частоты сердечных сокращений. Самцам яванского макака массой от 3 до 5 кг хирургически имплантировали радиотелеметрический передатчик. В день 0 каждому животному вводили однократный IV болюс физиологического раствора (PBS; n=10) или 25 мг/кг R5381 (n=13). В день 3 каждому животному вводили 3 дозы 2,5 мг/кг/дозу мидодрина (n=6 в группе физиологического раствора; n=7 в группе R5381) или

воду/носитель (n=4 в группе физиологического раствора; n=6 в группе R5381), вводимые посредством желудочного зонда с интервалами между дозами от 3 до 4 часов, что указано пунктирными линиями на оси x. Измерения частоты сердечных сокращений собирали для каждого животного перед введением дозы (для исходных измерений) и во время 4-дневного периода мониторинга после введения дозы. Показаны средние изменения относительно исходной частоты сердечных сокращений для каждой исследуемой группы между 35 и 72 часами после введения R5381 дозы. Данные выражают как среднее для группы \pm стандартная ошибка среднего.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[067] Перед описанием способов по настоящему изобретению, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, т.к. такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем описании, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления, а не для ограничения, т.к. объем изобретения будет ограничен только формулой изобретения.

[068] Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают значением, общепринято понятным специалисту в области, к которой настоящее изобретение принадлежит. Хотя в практическом осуществлении или тестировании изобретения можно использовать любые способы и материалы, схожие или эквивалентные представленным в настоящем описании, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, указанные в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки в полном объеме.

Определения

[069] Термин "NPR1", также обозначаемый как "NPRA," относится к рецептору 1 натрийуретического пептида (также известному как рецептор А натрийуретического пептида). NPR1 является гомодимерной трансмембранной гуанилатциклазой, ферментом, катализирующим синтез цГМФ. Белок имеет 4 отдельные области, содержащие внеклеточный лиганд-связывающий домен, одну трансмембранную область, внутриклеточный протеинкиназа-подобный гомологичный домен и гуанилилциклазный каталитический домен. Примером аминокислотной последовательности полноразмерного белка NPR1 является аминокислотная последовательность, приведенная в UniProtKB/Swiss-Prot под регистрационным номером P16066.1 (SEQ ID NO: 59):

```

1  mppgrrpags rlrlllllll pplllllrgs hagnltvavv lplantsypw swarvgpave
61 lalaqvkarp dllpgwtvrt vlgsenalg vcsdtaapla avdlkwehnp avflgpgcvy
121 aaarpvgrfta hwrvplltag apalgfgvkd eyaltragg syaklgdfva alhrrlgwer
181 qalmlyayrp gdeehcfflv egfmrvrdr lnitvdhlef aeddlshytr llrtmprkgr
241 viyicsspda frtlmlale aglgedyvf fhldifgqsl qggqgpaprr pwerdgdqdv
301 sarqafqaak iitykdpdnp eyleflkqlk hlayeqfnft medglvntip asfhdgllly
361 iqavtetlah ggtvtdgeni tqrmwnrsfq gvtgylkids sgdretdfsl wdmpengaf
421 rvvlningts qelvavsrk lnwplgyppp dipkcgfdne dpacnqdhls tlevlalgvs

```

481 lsllgilivs ffiyrkmqle kelaselwrv rwedvepssl erhlrsagsr ltlsgrgsny
 541 gslttteggf qvfaktayyk gnlvavkrvn rkrieltrkv lfelkhmrdv qnehltrfvq
 601 actdppnici lteycprgsl qdilenesit ldwfmfryslt ndivkgmlfl hngaicshgn
 661 lkssncvvdg rfvkkitdyg lesfrldpe qghtvyakkl wtapellrma sppvrgsqag
 721 dvysfgiilq eialrsgvfh vegldlspke iiervtreq pppfrslalq shleelgllm
 781 qrcwaedpqe rppfqqirlt lrkfnrenss nildnllsrm eqyannleel veertqayle
 841 ekrkaeally qilphsvaeq lkrgetvqae afdsvtiyfs divgftalsa estpmqvvtl
 901 lndlytcfda vidnfdvykv etigdaymvv sglpvrngri hacevarmal alldavrsfr
 961 irhrpqeqlr lrigihtgpv cagvvglkmp ryclfgdtnv tasrmesnge alkhlssst
 1021 kavleefggf elelrgdvem kgkgkvrtyw llgergsstr g

[070] Термин "NPR1" включает рекомбинантный белок NPR1 или его фрагмент. Термин также включает белок NPR1 или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью.

[071] В рамках изобретения термин "агонист NPR1" относится к молекуле, активирующей, повышающей или потенцирующей активность NPR1 или стабилизирующей активированную конформацию NPR1. В предпочтительных вариантах осуществления термин "агонист NPR1" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, специфически связывающемуся с NPR1 и активирующему или повышающему по меньшей мере одну биологическую активность NPR1. Такое агонистическое антитело против NPR1 может связываться с NPR1 в присутствии или отсутствие лиганда (например, ANP или BNP). В некоторых вариантах осуществления биологическая активность включает, в качестве неограничивающих примеров, снижение или уменьшение артериального давления у индивидуума после введения агонистического антитела против NPR1. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность включает гемодинамические изменения (например, снижение артериального давления) у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, такое как гипертензия, сердечная недостаточность или хроническое заболевание почек. Термин включает агонистические антитела против NPR1, описанные, например, в публикации США № 20200123263. В конкретном варианте осуществления термин относится к антителу против NPR1, содержащему HCVR SEQ ID NO: 48 и LCVR SEQ ID NO: 52. В другом конкретном варианте осуществления термин относится к R5381 (также известному как REGN5381). R5381 является полностью человеческим моноклональным антителом против NPR1, содержащим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

[072] В рамках изобретения "средство обратного действия" или "резервное средство" является средством, реверсирующим гемодинамические эффекты агониста NPR1. Термины "средство обратного действия" и "резервное средство" используют в настоящем описании взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления средство обратного действия, как указано в настоящем описании, реверсируют гемодинамические

изменения, ассоциированные с введением (индивидууму) агонистического антитела или антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающегося с NPR1. Термин "реверсирует" включает повышение артериального давления индивидуума, артериальное давление которого снижено в результате введения агониста NPR1. Повышение артериального давления можно измерять с использованием любых стандартных способов оценки артериального давления (например, сфигмоманометра), известных в этой области. Повышение может являться повышением до уровня до лечения агонистическим антителом или уровня, приводящего к адекватной гемодинамической стабильности. Гемодинамические эффекты могут включать косвенные эффекты, эффекты, ассоциированные с падением артериального давления. Эти эффекты можно аналогичным образом оценивать с использованием средств, представленных в настоящем описании. Гемодинамические эффекты, как указано в настоящем описании, могут включать физиологические параметры, такие как артериальное давление и частота сердечных сокращений, или клинические признаки, такие как головокружение, ощущение пустоты в голове, неясное зрение, тошноту, утомляемость. В некоторых вариантах осуществления средство обратного действия специфически связывается с агонистом NPR1 и реверсирует гемодинамические эффекты, вызванные агонистом NPR1. В конкретных вариантах осуществления средство обратного действия содержит иммуноглобулиновый белок, как представлено в настоящем описании.

[073] В рамках изобретения термин "иммуноглобулиновый белок" относится к антигенсвязывающим молекулам, содержащим по меньшей мере один иммуноглобулиновый переменный домен. По меньшей мере один переменный домен является антигенсвязывающим доменом и содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменный домен содержится в Fab, Fv, одноцепочечном Fv или любом другом антигенсвязывающем фрагменте антитела, как представлено где-либо в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления переменный домен содержится в моновалентном или бивалентном антителе. Термин включает, в качестве неограничивающих примеров, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, моновалентные антитела, бивалентные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Иммуноглобулиновый белок также может содержать мультимеризационный компонент, связанный с переменным доменом. Как представлено где-либо в настоящем описании, мультимеризационный компонент может содержать Fc-фрагмент антитела или укороченную тяжелую цепь антитела. Например, иммуноглобулиновый белок по изобретению может содержать один переменный домен в Fab, где Fab связан с по меньшей мере одним Fc-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновый белок содержит: (i) тяжелую цепь, содержащую константную область тяжелой цепи и переменную область тяжелой цепи, (ii) легкую цепь, содержащую константную область легкой цепи и переменную область легкой цепи, и (iii) полипептид, содержащий Fc-фрагмент или укороченную тяжелую цепь. В некоторых

вариантах осуществления полипептид Fc-домена является "Fc-пустышкой", что обозначает полипептид Fc-домена, несвязанный с антигенсвязывающим доменом. Иммуноглобулиновые белки, содержащие один вариабельный домен, можно обозначать как "одноплечевые" или "моновалентные" антитела. В контексте настоящего изобретения, термин относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с вариабельной областью другого антитела ("антиидиотипическому антителу"). В конкретных вариантах осуществления термин относится к антителу (или его антигенсвязывающему фрагменту), содержащему один вариабельный домен, специфически связывающийся с антителом против NPR1 или его антигенсвязывающим фрагментом. В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающееся с антителом против NPR1, является конкурентным связывающим средством. Одноплечевые антитела по изобретению могут содержать любые из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в таблице 1 в настоящем описании. Примеры одноплечевых антител против R5381, представленных в настоящем описании, включают REGN9035 и REGN9037.

[074] Если не указано иначе, в рамках изобретения термин "антитело" предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных друг с другом дисульфидными связями (т.е. "молекул полных антител"), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. В контексте изобретения термин "бивалентные антитела" относится к "молекулам полных антител", т.е. содержащим 2 тяжелые цепи и 2 легкие цепи. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи ("HCVR" или "V_H") и константной области тяжелой цепи (состоящей 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 дополнительно можно разделять на области гипервариабельности, обозначаемые как определяющие комплементарность области (CDR), чередующиеся с областями, являющимися более консервативными, обозначаемыми как каркасные области (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В некоторых вариантах осуществления изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут являться идентичными последовательностям зародышевой линии человек или природно или искусственно модифицированными. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определять с учетом параллельного анализа двух или более CDR.

[075] В некоторых вариантах осуществления термин "антитело" или "антигенсвязывающий молекула" включает моновалентные антигенсвязывающие молекулы. Моновалентная антигенсвязывающая молекула содержит один антигенсвязывающий домен, образованный одной тяжелой цепью и одной легкой цепью. Моновалентная антигенсвязывающая молекула дополнительно включает полипептид,

содержащий по меньшей мере Fc-домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc-домена является "Fc-пустышкой", обозначающей полипептид Fc-домена, не связанный с антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления моновалентное антитело имеет полную тяжелую цепь, полную легкую цепь и укороченную тяжелую цепь.

[076] В рамках изобретения термин "Fc-фрагмент" или "Fc-область" относится к области кристаллизуемого фрагмента иммуноглобулина, являющейся хвостовой областью антитела, взаимодействующей с рецепторами поверхности клетки, называемыми Fc-рецепторами, и некоторыми белками системы комплемента. Это свойство позволяет антителам активировать иммунную систему. В антителах изотипов IgG, IgA и IgD Fc-область или Fc-домен происходит из второго и третьего константных доменов (CH2 и CH3) тяжелой цепи антитела; Fc-области IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (домены CH2-4) в полипептидной цепи. В контексте изобретения термин относится к Fc-области, происходящей из Fc-домена человека, если не указано иначе. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент происходит из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

[077] В рамках изобретения термин "мультимеризационный компонент" относится к любой макромолекуле, обладающей способностью ассоциироваться со второй макромолекулой той же или схожей структуры или строения. Например, мультимеризационный компонент может являться полипептидом, содержащим домен CH3 иммуноглобулина. Неограничивающим примером мультимеризационного компонента является Fc-часть антитела (содержащая домен CH2-CH3), например, Fc-домен IgG, выбранного из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа с каждой группе изотипов. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению содержат мультимеризационный компонент, содержащий по меньшей мере один Fc-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки содержат два Fc-фрагмента. Первый и второй Fc-фрагменты могут принадлежать одному изотипу IgG, такому как, например, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Альтернативно, первый и второй Fc-фрагменты могут иметь разные изотипы IgG, такие как, например, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т.д. В некоторых вариантах осуществления 2 Fc-фрагмента имеют идентичную последовательность. В некоторых вариантах осуществления 2 Fc-фрагмента отличаются друг от друга на одну или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-фрагмент или второй Fc-фрагмент, но не оба Fc-фрагмента, содержит модификацию в домене CH3, снижающую связывание иммуноглобулинового белка с протеином А по сравнению с иммуноглобулиновым белком, в котором отсутствует модификация. В некоторых вариантах осуществления мультимеризационный компонент является Fc-фрагментом или аминокислотной последовательностью длиной от 1 до приблизительно 200 аминокислот, содержащей по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах осуществления мультимеризационный компонент является остатком цистеина или коротким цистеин-

содержащим пептидом. Другие мультимеризационные компоненты включают пептиды или полипептиды, содержащие из лейциновой молнии, мотива спираль-петля или мотива суперспирали. Мультимеризационный компонент, содержащий, например, Fc-домены, может содержать одно или более изменений аминокислот (например, инсерций, делеций или замен) по сравнению с природной версией Fc-домена дикого типа, как представлено где-либо в настоящем описании.

[078] Также возможна замена одного или более остатков CDR или пропуск одной или более CDR. Антитела описаны в научной литературе, где можно опускать одну или две CDR для связывания. Padlan, et al., (1995 FASEB J. 9:133-139) анализировали области контакта между антителами и их антигенами с учетом опубликованных кристаллических структур и сделали вывод, что только приблизительно от одной пятой до одной трети остатков CDR на самом деле контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил множество антител, в которых одна или две CDR не имели аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также, Vajdos, et al., 2002 J Mol Biol 320:415-428).

[079] Остатки CDR, неконтактирующие с антигеном, можно идентифицировать с учетом предшествующих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 зачастую не нужны) относительно областей CDR по Kabat, лежащих вне CDR по Chothia, посредством молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или их остатки опущены, их, как правило, заменяют аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности антитела человека или консенсусе таких последовательностей. Положения для замены в CDR и аминокислоты, подлежащие замене, также можно выбирать эмпирически. Эмпирические замены могут являться консервативными или неконсервативными заменами.

[080] Полностью человеческие иммуноглобулиновые белки (специфически связывающиеся с антителами против NPR1), представленные в настоящем описании, могут содержать одну или более замен, инсерций и/или делеций аминокислот в каркасных областях и/или CDR переменных доменов тяжелых и легких цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации легко можно определять посредством сравнения аминокислотных последовательностей, представленных в настоящем описании, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, в общедоступных базах последовательности антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, полученные из любых аминокислотных последовательностей, представленных в настоящем описании, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или CDR подвергаются мутагенезу в соответствующие остатки последовательности зародышевой линии, из которой получают антитело, или в соответствующие остатки другой последовательности зародышевой линии человека, или консервативную аминокислотную замену соответствующих остатков зародышевой линии (такие изменения последовательности в настоящем описании совокупно обозначают как "мутации зародышевой линии").

[081] Специалист в этой области, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепи, представленных в настоящем описании, легко может получать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все из остатков каркаса и/или CDR в доменах V_H и/или V_L подвергнуты обратной мутации в остатки, обнаруживаемые в исходной последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело. В других вариантах осуществления только некоторые остатки подвергнуты обратной мутации в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутантные остатки, обнаруживаемые в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутантные остатки, обнаруживаемые в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более из остатков каркаса и/или CDR подвергнуты мутации в соответствующие остатки другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, отличающейся от последовательности зародышевой линии, из которой антитело исходно получают). Кроме того, антитела по изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных областях и/или CDR, например, где некоторые отдельные остатки подвергнуты мутации в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, отличающиеся от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или подвергнуты мутации в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или более мутаций зародышевой линии, легко можно тестировать на одно или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или повышенные антагонистические биологические свойства, сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные в соответствии с этим общим принципом, включены в настоящее изобретение.

[082] Настоящее изобретение также включает полностью человеческие иммуноглобулиновые белки (специфически связывающиеся с антителами против NPR1), содержащие варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в настоящем описании, имеющих одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает полностью человеческие иммуноглобулиновые белки (специфически связывающиеся с антителами против NPR1), 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 любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в настоящем описании.

[083] В рамках изобретения термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. включают любой природный,

получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, специфически связывающееся с антигеном с образованием комплекса. В рамках изобретения термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или более фрагментам антитела, сохраняющим способность специфически связываться с антигеном против NPR1. Фрагмент антитела может включать Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. В некоторых вариантах осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получать, например, из молекул полных антител любыми подходящими стандартными способами, такими как способы протеолитического расщепления или рекомбинантные способы генетической инженерии, включающие манипуляции и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, в коммерческих источниках, библиотеках ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и подвергать манипуляции химически или способами молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для встраивания кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

[084] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящий из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или затрудненный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с делетированными доменами, химерные антитела, антитела с пересажеными CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) и переменные домены IgNAR акул, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент" в рамках изобретения.

[085] Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, смежную или находящуюся в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, ассоциированный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут быть расположены друг относительно друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область

может являться 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 .

[086] 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 можно обнаружить в антигенсвязывающем фрагменте антитела по 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 указанных выше примеров конфигураций, переменные и константные домены можно напрямую связывать друг с другом или соединять с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между смежными переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любых из указанных выше конфигураций переменных и константных доменов в нековалентном соединении друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидных связей).

[087] В рамках изобретения термин "антитело человека", или "полностью человеческое антитело", или "полностью человеческий иммуноглобулиновый белок" предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. mAb человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, неcodируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, встраиваемые посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или в результате соматической мутации *in vivo*), например, в CDR, и в частности, CDR3. Однако, в рамках изобретения термин "антитело человека" или "полностью человеческое антитело" не предназначен для включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), пересажены на последовательности FR человека. Термин включает антитела, продуцируемые рекомбинантно в неявляющемся человеком млекопитающем или клетках неявляющегося человеком млекопитающего. Термин не предназначен для включения антител, выделенных из организма человека или образующихся в нем.

[088] В рамках изобретения термин "рекомбинантный" относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам по изобретению, созданным, экспрессируемым, выделенным или полученным с помощью технологий или известных в этой области способов, таких как технология рекомбинантных ДНК, включающих, например,

сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к антителам, экспрессируемым в неявляющемся человеком млекопитающем (включая трансгенных, неявляющихся человеком млекопитающих, например, трансгенных мышах) или клеточной системе экспрессии (например, клетках CHO) или выделенным из рекомбинантной комбинаторной библиотеке антител человека.

[089] Термин "специфически связывается", "специфически связывается с" или т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс, например, с антителом против NPR1, являющийся относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовывать с помощью равновесной константы диссоциации по меньшей мере приблизительно 1×10^{-8} М или менее (например, меньшая K_D означает более сильное связывание). Способы определения того, связываются ли специфически две молекулы, хорошо известны в этой области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Как представлено в настоящем описании, с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, идентифицированы антитела, специфически связывающиеся с антителом против NPR1 (например, R5381). Кроме того, мультиспецифические антитела, связывающиеся с одним доменом в антителе против NPR1 и одним или более дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, связывающиеся с двумя разными областями антитела против NPR1, тем не менее, в рамках изобретения считают "специфически связывающимися" антителами.

[090] Термин "высокоаффинное" антитело относится к mAb, имеющим аффинность связывания с антителом против NPR1, выраженную как K_D , по меньшей мере 10^{-8} М; предпочтительно - 10^{-9} М; более предпочтительно - 10^{-10} М, даже более предпочтительно - 10^{-11} М, что измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™ или ELISA для определения аффинности в растворе.

[091] Термин "низкая скорость обратной реакции", " K_{off} " или " k_d " означает, что антитело диссоциирует от антитела против NPR1 с константой скорости 1×10^{-3} сек⁻¹ или менее, предпочтительно - 1×10^{-4} сек⁻¹ или менее, что определяют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™.

[092] В рамках изобретения термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. включают любой природный, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, специфически связывающийся с антигеном с образованием комплекса. "Антигеном" для иммуноглобулиновых белков, представленных в настоящем описании, является антитело против NPR1 (например, R5381) или его антигенсвязывающий фрагмент (т.е. фрагмент антитела, связывающийся с NPR1). В рамках изобретения термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или более фрагментам антитела, сохраняющим способность связываться с антителом против NPR1.

[093] В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагменты антител по изобретению можно конъюгировать с таким остатком, как лиганд или терапевтический остаток ("иммуноконъюгат"), второе резервное средство или любой другой терапевтический остаток, который можно использовать для реверсирования гемодинамических эффектов антитела против NPR1.

[094] В рамках изобретения термин "выделенное антитело" предназначен для обозначения антитела, по существу, не содержащего другие антитела (Ab), имеющие другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с антителом против NPR1, или его фрагмент, по существу, не содержит Ab, специфически связывающиеся с иными антигенами, чем антитела против NPR1).

[095] В рамках изобретения термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, делающему возможным анализ биомолекулярных взаимодействий в реальном времени посредством детекции изменений концентраций белков в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden и Piscataway, N.J.).

[096] В рамках изобретения термин " K_D " предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации в конкретном взаимодействии антитело-антиген. В контексте изобретения "антигеном" для иммуноглобулиновых белков является антитело против NPR1 (например, R5381) или его антигенсвязывающий фрагмент (т.е. фрагмент антитела, связывающийся с NPR1).

[097] Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, взаимодействующей со специфическим антигенсвязывающим участком в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. "Антигеном" для иммуноглобулиновых белков является антитело против NPR1 (например, R5381) или его антигенсвязывающий фрагмент (т.е. фрагмент антитела, связывающийся с NPR1). Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные иммуноглобулиновые белки (антитела) могут связываться с разными областями на антигене и могут иметь разные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к участку на антигене, на который отвечают В- и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, связываемой антителом. Эпитопы можно определять как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, являются подгруппой структурных эпитопов и имеют остатки, напрямую вносящие вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут являться конформационными, т.е. состоящими из нелинейных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, являющиеся химически активными поверхностными группировками молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в некоторых вариантах осуществления могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические зарядовые характеристики.

[098] В рамках изобретения термин "перекрестно конкурирует" означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном и ингибирует

или блокирует связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. "Антигеном" для иммуноглобулиновых белков является антитело против NPR1 (например, R5381) или его антигенсвязывающий фрагмент (т.е. фрагмент антитела, связывающийся с NPR1). Термин также включает конкуренцию между двумя антителами в обеих ориентациях, т.е. первой 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 ингибирует или блокирует связывание второго антитела, например, в результате стерического затруднения. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерять известными в этой области способами, например, посредством безмаркерного анализа интерферометрии биослоя в реальном времени. Перекрестную конкуренцию между двумя антителами можно выражать как связывание второго антитела, которое меньше фонового сигнала из-за самоселективного связывания (где первое и второе антитела являются одним и тем же антителом). Перекрестную конкуренцию между 2 антителами можно выражать, например, как % связывания второго антитела, которое меньше базового самоселективного фонового связывания (где первое и второе антитела являются одним и тем же антителом).

[099] Термин "значительная идентичность" или "в значительной степени идентичный" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента означает, что при оптимальном выравнивании с подходящими инсерциями или делециями нуклеотидов с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) имеет место идентичность нуклеотидной последовательности в по меньшей мере приблизительно 90%, и более предпочтительно - по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% оснований нуклеотидов, что измеряют с помощью любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательности, такого как FASTA, BLAST или GAP, как описано ниже. В некоторых случаях молекула нуклеиновой кислоты, имеющая значительную идентичность в отношении референсной молекулы нуклеиновой кислоты, может кодировать полипептид, имеющий ту же или в значительной степени схожую аминокислотную последовательность с полипептидом, кодируемым референсной молекулой нуклеиновой кислоты.

[0100] Что касается полипептидов, термин "значительное сходство" или "в значительной степени схожий" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием весов пропуска по умолчанию, обладают по меньшей мере 90% идентичности последовательности, даже более предпочтительно - по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно, положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" является заменой, при которой аминокислотный остаток заменяют другим аминокислотным остатком, имеющим

боковую цепь (R-группу) со схожими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В основном, 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 сходства можно корректировать в сторону повышения с поправкой на консервативную природу замены. Способы осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в этой области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенную в настоящее описание в качестве ссылки. Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи со схожими химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксил-содержащие боковые цепи: серин и треонин; 3) амид-содержащие 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. Группы предпочтительных консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet, et al., (1992) *Science* 256: 1443-45, включенной в настоящее описание в качестве ссылки. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, имеющее ненегативное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0101] Сходство последовательности для полипептидов, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет схожие последовательности с использованием показателей сходства, приписываемых различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процент идентичности последовательности для областей лучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности, BLASTP или TBLASTN, с

использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul, et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки.

[0102] Фраза "терапевтически эффективное количество" означает количество, приводящее к желаемому эффекту, ради которого ее вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения, и его может определять специалист в этой области известными способами (см., например, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Comounding). Например, в одном из вариантов осуществления терапевтически эффективное количество резервного средства по изобретению является количеством, приводящим к некоторой степени реверсирования гемодинамических эффектов агониста рецептора 1 натрийуретического пептида (NPR1).

[0103] В рамках изобретения термин "индивидуум" относится к животному, предпочтительно - млекопитающему, более предпочтительно - человеку. В конкретных вариантах осуществления изобретения индивидуум испытывал, испытывает или может испытывать падение артериального давления или изменение других гемодинамических параметров, ассоциированных с введением агонистического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающегося с NPR1.

[0104] В рамках изобретения термины "лечить" или "лечение" относятся к снижению или улучшению тяжести по меньшей мере одного симптома или показания заболевания или нарушения в результате введения нуждающемуся в этом индивидууму терапевтического средства, такого как иммуноглобулиновый белок, представленный в настоящем описании. Термины включают ингибирование прогрессирования заболевания или ухудшения симптома/показания. Термины также включают положительный прогноз заболевания, т.е. индивидуум может не иметь заболевания или может иметь уменьшение заболевания после введения терапевтического средства, такого как антитело по изобретению. Терапевтическое средство можно вводить индивидууму в терапевтической дозе.

[0105] Термины "предотвращать", "предотвращение" или "профилактика" относятся к ингибированию манифестации заболевания или нарушения или любых симптомов или показаний такого заболевания или нарушения после введения терапевтического средства.

Получение иммуноглобулиновых белков человека

[0106] Вариабельные (антигенсвязывающие) домены иммуноглобулинов, специфические для конкретных антигенов, можно получать с помощью технологии получения антител, известной в этой области. После получения их можно соответствующим образом располагать для получения молекулы иммуноглобулинового белка по изобретению рутинными способами (обсуждение примеров компонентов и форматов иммуноглобулиновых белков, которые можно использовать для конструирования молекул иммуноглобулиновых белков по изобретению, приведены в других местах в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления один или

более из отдельных компонентов (например, переменные области тяжелой и легкой цепи) белков по изобретению получают из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в этой области. Например, антитела человека можно получать в трансгенных мышцах.

[0107] в контексте изобретения для получения антител человека, специфически связывающихся с антителом против NPR1, можно использовать любые такие известные способы. В одном из вариантов осуществления антитело против NPR1 является R5381.

[0108] Для получения антител против антитела против NPR1 можно использовать иммуноген, содержащий любое из следующего. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки (антитела) по изобретению получают из мышей, иммунизированных полноразмерным антителом против NPR1 (например, R5381) или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. Альтернативно, белок или его фрагмент можно получать стандартными биохимическими способами с и модифицировать и использовать в качестве иммуногена.

[0109] В некоторых вариантах осуществления иммуноген может являться рекомбинантным антителом против NPR1 или его антигенсвязывающим фрагментом, экспрессируемым в *E. coli* или любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка (CHO).

[0110] Одну или более из тяжелых и/или легких цепей иммуноглобулиновых белков по изобретению можно получать с использованием технологии VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител. Используя технологию VELOCIMMUNE®, исходно выделяют высокоаффинные химерные антитела против антитела против NPR1 (например, R5381), имеющие переменную область человека и константную область мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает получение трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши таким образом, что мышь продуцирует антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую переменные области тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепи человека. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

[0111] Как и в экспериментальном разделе ниже, антитела охарактеризовывают и выбирают по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Константные области мыши заменяют желаемой константной областью человека для получения полностью человеческого антитела по изобретению, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Хотя выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного использования,

характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности к мишени зависят от вариабельной области.

Биоэквиваленты

[0112] Иммуноглобулиновые белки по изобретению включают белки, имеющие аминокислотные последовательности, варьирующиеся относительно описываемых антитела, но сохраняющие способность связываться с антителом против NPR1, например, R5381. Такие варианты белков содержат одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с родительской последовательностью, но демонстрируют биологическую активность, по существу, эквивалентную активности описанных белков (например, антител). Аналогично, последовательности ДНК иммуноглобулиновых белков (например, кодирующие антитело) включают последовательности, содержащие одно или более добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с описанной последовательностью, но кодирующие антитело или фрагмент антитела, по существу, биоэквивалентное иммуноглобулиновому белку (например, антителу или фрагменту антитела) по изобретению.

[0113] Два антигенсвязывающих белка или антитела считают биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых не демонстрирует значимых различий при введении в одинаковой молярной дозе в схожих экспериментальных условиях в однократной дозе или многократных дозах. Некоторые антитела будут считать эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени абсорбции, но не по скорости абсорбции, и их все еще можно считать биоэквивалентными, т.к. такие различия скорости абсорбции являются умышленными и отражены в маркировке, но они неважны для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при постоянном использовании, и их считают медицински незначимыми для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

[0114] В одном из вариантов осуществления два иммуноглобулиновых белка являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий их безопасности, чистоты или эффективности.

[0115] В одном из вариантов осуществления два иммуноглобулиновых белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или более раз между референсным препаратом и биологическим препаратом без ожидаемого повышения риска неблагоприятных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или сниженную эффективность по сравнению с продолжающейся терапией без такого переключения.

[0116] В одном из вариантов осуществления два иммуноглобулиновых белка являются биоэквивалентными, если оба действуют с помощью общего механизма или механизмов действия в условиях или условиях использования в той степени, в которой такие механизмы известны.

[0117] Биоэквивалентность можно продемонстрировать способами *in vivo* и/или *in vitro*. Показатели биоэквивалентности включают, например, (a) тестирование *in vivo* на людях или других млекопитающих, при котором концентрацию иммуноглобулинового белка или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию времени; (b) тестирование *in vitro*, коррелирующее и являющееся обоснованно прогностическим для данных о биодоступности у людей *in vivo*; (c) тестирование *in vivo* на людях или других млекопитающих, при котором соответствующий острый фармакологический эффект иммуноглобулинового белка (например, антитела (или его мишени)) измеряют как функцию времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом испытании, в котором определяют безопасность, эффективность, или биодоступность, или биоэквивалентность иммуноглобулинового белка.

[0118] Биоэквивалентные варианты иммуноглобулиновых белков (например, антител) по изобретению можно конструировать, например, осуществляя различные замены остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. "Биологическая активность" иммуноглобулиновых белков по изобретению (например, антитела или фрагмента антитела, специфически связывающегося с R5381) включает, в качестве неограничивающих примеров, специфическое связывание антигена (например, антитела против NPR1 R5381), реверсирование гемодинамических эффектов антитела против NPR1 и повышение артериального давления, резко снижающегося в результате введения антитела против NPR1. В некоторых вариантах осуществления положительному влиянию также подвергаются кровоток, сердечная нагрузка и/или частота сердечных сокращений. Например, остатки цистеина, не являющиеся важными для биологической активности, можно подвергать делеции или заменять другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутренних дисульфидных мостиков после ренатурации. В другом контексте биоэквивалентные иммуноглобулиновые белки могут включать варианты антител, содержащие изменения аминокислот, модифицирующие характеристики гликозилирования антител, например, мутации, элиминирующие или устраняющие гликозилирование.

Иммуноглобулиновые белки, содержащие варианты Fc

[0119] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуноглобулиновым белкам, содержащим Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, повышающих или снижающих связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает иммуноглобулиновые белки, связывающиеся с антителами против NPR1 и содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, где мутации повышают аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить

к повышению времени полувыведения иммуноглобулинового белка в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном из вариантов осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I), и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация включает модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

[0120] Например, настоящее изобретение включает иммуноглобулиновые белки, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации указанных выше мутаций Fc-домена и других мутаций в вариабельных доменах антитела, представленных в настоящем описании, включены в объем изобретения.

[0121] Настоящее изобретение также включает иммуноглобулиновые белки, содержащие первый домен C_H3 и второй домен C_H3 Ig, где первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и где по меньшей мере одно отличие аминокислоты снижает связывание иммуноглобулинового белка с протеином А по сравнению с белком, в котором отсутствует отличие аминокислоты. В одном из вариантов осуществления первый домен C_H3 Ig связывается с протеином А, и второй домен C_H3 Ig содержит мутацию, снижающую или устраняющую связывание с протеином А, такую как H315R по нумерации EU. Второй C_H3 может дополнительно содержать Y316F по нумерации EU. В одном из вариантов осуществления первый домен C_H3 Ig связывается с протеином А, и второй домен C_H3 Ig содержит мутацию, снижающую или устраняющую связывание с протеином А, такую как модификация H95R (по нумерации экзонов IMGT; H435R по нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). См., например, патент США № 8586713. Дополнительные модификации, которые можно найти во втором C_H3 включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае IgG1 антитела; N44S, K52N и V82I (IMGT;

N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4.

[0122] Настоящее изобретение также включает иммуноглобулиновые белки, связывающиеся с антителами против NPR1 и содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C_H), где химерная область C_H содержит сегменты, полученные из областей C_H более одного изотипа иммуноглобулина. Например, иммуноглобулиновые белки по изобретению могут содержать химерную область C_H , содержащую весь домен C_{H2} или его часть, полученный из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации со всем доменом C_{H3} или его частью, полученным из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению содержат химерную область C_H , имеющую химерную шарнирную область. Например, химерная шарнирная область может содержать аминокислотную последовательность "верхней шарнирной области" (аминокислотные остатки положений 216-227 по нумерации EU), полученную из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с последовательностью "нижней шарнирной области" (аминокислотными остатками положений 228-236 по нумерации EU), полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхней шарнирной области IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, полученные из нижней шарнирной области IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную область C_H , как представлено в настоящем описании, в некоторых вариантах осуществления может демонстрировать модифицированные эффекторные функции Fc без нежелательного влияния на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела (см., например, публикацию патентной заявки США 2014/0243504, описание которой, таким образом, включено в качестве ссылки в полном объеме).

Биологические характеристики иммуноглобулиновых белков

[0123] В основном, иммуноглобулиновые белки по изобретению функционируют посредством связывания с агонистом NPR1 (таким как антитело против NPR1) и реверсирования его гемодинамических эффектов. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, связывающиеся (родительская гибридома) с антителом против NPR1 с K_D менее приблизительно 3 нМ при 25°C и менее приблизительно 7 нМ при 37°C, что измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с родительской гибридомой антитела против NPR1 с K_D менее приблизительно 25 нМ, менее приблизительно 10 нМ, менее приблизительно 7 нМ, менее приблизительно 6 нМ, менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 4 нМ, менее приблизительно 3 нМ, менее приблизительно 2 нМ, менее

приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 0,75 нМ или менее приблизительно 0,5 нМ, что измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем описании, или в значительной степени схожего анализа.

[0124] Настоящее изобретение также включает иммуноглобулиновые белки и их фрагменты, связывающиеся с агонистом NPR1 в зависимости от pH. Например, k_d и диссоциативное время полувыведения ($t_{1/2}$) REGN9035 и REGN9037 варьируются в буферах с pH 7,4, pH 6,5, pH 6,0 и pH 5,0, как показано в примере 5 в настоящем описании. В случае REGN9035 диссоциативное время полувыведения ($t_{1/2}$) значительно снижается со снижением pH с приблизительно 12 минут до приблизительно 0,6 минут; в случае REGN9037 диссоциативное время полувыведения ($t_{1/2}$) немного варьируется со снижением pH с приблизительно 13 до приблизительно 17 минут. k_d для каждого из них аналогично варьируется - в случае REGN9035 приблизительно от 9,96E-04 до 1,97E-02 и в случае REGN9037, приблизительно от 8,67E-04 до приблизительно 6,64E-04.

[0125] Настоящее изобретение также включает иммуноглобулиновые белки и их фрагменты, ингибирующие активацию hNPR1, индуцируемую антителом против NPR1. Например, бивалентные и моновалентные антитела против R5381 и их антигенсвязывающие фрагменты блокируют R5381-индуцированную активацию hNPR1 в присутствии и отсутствие эндогенных лигандов (например, ANP, BNP). Максимальное ингибирование (от приблизительно 97% до приблизительно 106%) R5381-индуцированной активации NPR1 измеряли по накоплению цГМФ, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 6 в настоящем описании, или в значительной степени схожего анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению ингибируют индуцированную антителом против NPR1 активацию hNPR1 на по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99%, по меньшей мере приблизительно 100%, по меньшей мере приблизительно 101%, по меньшей мере приблизительно 102%, по меньшей мере приблизительно 103%, по меньшей мере приблизительно 104% или по меньшей мере приблизительно 105%, по меньшей мере приблизительно 106%.

[0126] Настоящее изобретение также включает иммуноглобулиновые белки и их фрагменты, блокирующие связывание антитела против NPR1 с hNPR1. Например, бивалентные и моновалентные антитела против R5381 и их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание биотин-R5381 с NPR1 человека, что оценивали с использованием ELISA блокирования, как описано в примере 7, или в значительной степени схожего анализа. Определяли приблизительно 99%-ное и приблизительно 100%-ное блокирование в случае моновалентных/одноплечевых и бивалентных антител против

R5381, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению блокируют приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% связывания антитела против NPR1 с hNPR1.

[0127] Настоящее изобретение также включает иммуноглобулиновые белки и их фрагменты, образующие минимальные циркулирующие иммунные комплексы (CIC) с агонистическим антителом против NPR1 или необразующие их. Например, бивалентные и моновалентные антитела против R5381 и их антигенсвязывающие фрагменты не образуют детектируемые CIC с R5381, что оценивали с использованием анализа C1q-CIC, как описано в примере 8, или в значительной степени схожего анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению не образуют CIC с антителами против NPR1. Наличие CIC в кровотоке статистически коррелирует с активностью заболевания.

[0128] Настоящее изобретение также включает иммуноглобулиновые белки и их фрагменты, реверсирующие гемодинамические эффекты антитела против NPR1. Например, бивалентные антитела против R5381 и их антигенсвязывающие фрагменты могут вызывать клиренс R5381 у мышей быстрее и эффективнее изотипического контроля, что оценивали посредством иммунологического анализа, как описано в примере 10, или в значительной степени схожего анализа. Концентрации R5381 в сыворотке были значимо ниже в день 7 и недетектируемыми ко дню 22. В качестве другого примера, бивалентные и моновалентные антитела против R5381 и их антигенсвязывающие фрагменты быстро и устойчиво реверсировали эффекты снижения артериального давления R5381, что оценивали посредством определения систолического давления, диастолического давления, пульсового давления и среднего артериального давления, а также частоты сердечных сокращений, как описано в примерах 11 и 12, или в значительной степени схожего анализа. Бивалентные и моновалентные антитела против R5381 и их антигенсвязывающие фрагменты также ингибировали NPR1-индуцированную продукцию цГМФ, что оценивали в моче с использованием ELISA, как описано в примерах 11 и 12, или в значительной степени схожего анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению повышают артериальное давление обратно до исходных уровней (т.е. уровней до падения артериального давления из-за введения антитела против NPR1).

[0129] В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному иммуноглобулиновому белку или его антигенсвязывающему фрагменту, специфически связывающемуся с антителом против NPR1 (таким как R5381), где иммуноглобулиновый белок демонстрирует одну или более из следующих характеристик: (a) содержит полностью человеческое моноклональное антитело; (b) содержит полностью человеческое моновалентное или одноплечевое антитело; (c) содержит один иммуноглобулиновый домен и мультимеризационный

компонент, содержащий по меньшей мере один Fc-фрагмент; (d) связывается с антителом против NPR1 при 25°C и 37°C с константой диссоциации (K_D) менее 7 нМ, что измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (e) демонстрирует рН-зависимую диссоциацию; (f) ингибирует от приблизительно 97% до приблизительно 106% индуцированной антителом против NPR1 активации NPR1; (g) блокирует связывание биотин-конъюгированного агонистического антитела против NPR1 с NPR1 человека; (h) не образует детектируемые CIC с антителом против NPR1; (i) приводит к клиренсу антитела против NPR1 из сыворотки быстрее изотипического контроля; (j) реверсирует эффекты снижения артериального давления антитела против NPR1; и (k) содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1.

[0130] Иммуноглобулиновые белки по изобретению могут иметь одну или более из указанных выше биологических характеристик или любые их комбинации. Другие биологические характеристики иммуноглобулиновых белков по изобретению будут очевидны специалисту в этой области из обзора изобретения в настоящем описании, включающего демонстрационные примеры.

Эпитопное картирование и связанные технологии

[0131] Настоящее изобретение включает иммуноглобулиновые белки, взаимодействующие с одной или более аминокислотами, обнаруживаемыми в одной или более областях молекулы антитела против NPR1. Эпитоп, с которым связываются иммуноглобулиновые белки, может состоять из единой смежной последовательности 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, локализованных в любых из указанных выше доменов молекулы антитела против NPR1 (например, линейный эпитоп в домене). Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), локализованных в любом или обоих из указанных выше доменов молекулы антитела (например конформационный эпитоп).

[0132] Для определения того "взаимодействует ли антитело с одной или более аминокислотами" в полипептиде или белке, можно использовать различные способы, известные специалистам в этой области. Примеры способов включают, например, рутинные анализы перекрестного блокирования, такие как описываемые в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие способы включают мутационный анализ посредством аланинового сканирования, пептидный блоттинг (Reineke, (2004) *Methods Mol. Biol.* 248:443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и анализ ЯМР. Кроме того, можно использовать такие способы, как эксцизия эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Другим способом, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым

взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, определяемый посредством масс-спектрометрии. В общих терминах, способ водородно-дейтериевый обмен включает мечение дейтерием интересующего белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, и заменяемые протоны в аминокислотах, защищенных комплексом антитела, подвергаются обратному обмену дейтерия на водород с меньшей скоростью, чем заменяемые протоны в аминокислотах, не являющихся частью поверхности контакта. В результате, аминокислоты, образующие часть поверхности контакта белок/антитело могут сохранять дейтерий и, таким образом, демонстрировать относительно более высокую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в поверхность контакта. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, таким образом, выявляя меченые дейтерием остатки, соответствующие конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring, (1999) *Analytical Biochemistry* 267:252-259; Engen and Smith, (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

[0133] Термин "эпитоп" относится к участку на антигене, на который отвечают В-и/или Т-клетки. В контексте изобретения антиген является антителом против NPR1. В-клеточные эпитопы могут образовываться из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, совмещенных в результате третичного фолдинга белка. Эпитопы, образующиеся из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образующиеся в результате третичного фолдинга, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Как правило, эпитоп включает по меньшей мере 3, и более типично - по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

[0134] Профилирование на основе модификаций (MAP), также известное как профилирование антител на основе структуры антигена (ASAP), является способом, которым классифицируют большие количества моноклональных антител (mAb) против одного и того же антигена в зависимости от сходства профиля связывания каждого антитела в химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигенов (см. US 2004/0101920, конкретно включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, совершенно отличающийся или частично перекрывающийся с эпитопом, представленным другой категорией. Эта технология делает возможной быструю фильтрацию генетически идентичных антител, таким образом, что характеристика может быть сфокусирована на генетически отличающихся антителах. В контексте скрининга гибридом MAP может облегчать идентификацию редких клонов гибридом, продуцирующих mAb, имеющие желаемые характеристики. MAP можно использовать для сортировки антител по изобретению в групп антител, связывающихся с разными эпитопами.

[0135] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает иммуноглобулиновые белки и их фрагменты, взаимодействующие с одним или более

эпитопами, обнаруживаемыми во внеклеточном домене антитела против NPR1. Эпитопы могут состоять из одной или более смежных последовательностей 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, локализованных во внеклеточном домене антитела против NPR1. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), локализованных в антителе против NPR1.

[0136] Настоящее изобретение включает антитела, связывающиеся с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любые из конкретных примеров иммуноглобулиновых белков, приведенных в таблице 1. Аналогично, настоящее изобретение также включает антитела, конкурирующие за связывание с антителом против NPR1 или его фрагментом с любыми из конкретных примеров иммуноглобулиновых белков, приведенных в таблице 1. Например, настоящее изобретение включает антитела, перекрестно конкурирующие за связывание с антителом против NPR1 или его фрагментом с одним или более антителами, приведенными в таблице 1.

[0137] То, связывается ли антитело с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с референсным иммуноглобулиновым белком, легко можно определять рутинными, известными в этой области способами. Например, для определения того, связывается ли тестовое антитело с тем же эпитопом, что и референсный иммуноглобулиновый белок по изобретению, референсному антителу позволяют связываться с белком или пептидом антитела против NPR1 в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестового антитела связываться с молекулой белка антитела против NPR1. Если тестовое антитело может связываться с антителом против NPR1 после насыщающего связывания с референсным иммуноглобулиновым белком, можно сделать вывод, что тестовое антитело связывается с иным эпитопом, чем референсный иммуноглобулиновый белок. С другой стороны, если тестовое антитело не может связываться с белком антитела против NPR1 после насыщающего связывания с референсным иммуноглобулиновым белком, тестовое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый с референсным иммуноглобулиновым белком по изобретению.

[0138] Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание с референсным иммуноглобулиновым белком, описанный выше анализ связывания осуществляют в двух ориентациях: в первой ориентации референсному антителу позволяют связываться с белком антитела против NPR1 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестового антитела с молекулой антитела против NPR1. Во второй ориентации тестовому антителу позволяют связываться с молекулой антитела против NPR1 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания референсного антитела с молекулой антитела против NPR1. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело может связываться с молекулой антитела против NPR1, делают вывод о том, что тестовое антитело и референсное антитело конкурируют за связывание с антителом против NPR1. Как будет понятно специалисту в этой области,

антитело, конкурирующее за связывание с референсным антителом, может не связываться с эпитопом, идентичным эпитопу референсного антитела, но может стерически блокировать связывание референсного антитела посредством связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

[0139] Два антитела связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. Антигеном является антитело против NPR1. Т.е. 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого на по меньшей мере 50%, но предпочтительно - на 75%, 90% или даже 99%, что измеряют in анализ конкурентного связывания (см., например, Junghans, et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если, по существу, все мутации аминокислот в антигене, снижающие или устраняющие связывание одного антитела снижают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые мутации аминокислот, снижающие или устраняющие связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого.

[0140] Затем можно осуществлять дополнительные рутинные эксперименты (например, анализ пептидных мутаций и связывания) для подтверждения того, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестового антитела является результатом связывания с тем же эпитопом, что и референсное антитело, или стерическое блокирование (или другое явление) отвечает за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого типа можно осуществлять с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в этой области.

Иммуноконъюгаты

[0141] Настоящее изобретение дополнительно включает иммуноглобулиновый белок человека, конъюгированный с терапевтическим остатком ("иммуноконъюгат"), для лечения NPR1-ассоциированного заболевания или нарушения (например, гипертензии) и/или улучшения гемодинамических эффектов, ассоциированных с терапевтическим использованием антитела против NPR1. В рамках изобретения термин "иммуноконъюгат" относится к иммуноглобулиновому белку, химически или биологически связанному с радиоактивным средством, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным остатком, ферментом, пептидом или белком, или терапевтическим средством. Указанный белок можно связывать с радиоактивным средством, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным остатком, ферментом, пептидом или терапевтическим средством в любом участке молекулы при условии, что он может связываться со своей мишенью, антителом против NPR1. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитело-лекарственное средство и слитые белки антитело-токсин. В одном из вариантов осуществления средство может являться вторым другим антителом против белка NPR1. При рассмотрении типа терапевтического остатка, который можно конъюгировать с

резервным средством, будут учитывать состояние, подвергаемое лечению, и желаемый терапевтический эффект, которого хотят достичь. В этой области известны примеры подходящих средств для получения иммуноконъюгатов; см., например, WO 05/103081.

Терапевтическое введение и составы

[0142] Настоящее изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим иммуноглобулиновые белки по изобретению. Терапевтические композиции по изобретению будут вводить с подходящими носителя, эксципиентами и другими средствами, включенными в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество подходящих составов можно найти в рецептурном справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липид-содержащие (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии "масло-в-воде" и "вода-в-масле", эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Также см. Powell, et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[0143] Доза иммуноглобулинового белка может варьироваться в зависимости от возраста и размера индивидуума, подвергаемого введению, состояния, пути введения и т.п. Если белок по изобретению используют для реверсирования гемодинамических эффектов антитела против NPR1 у взрослого пациента или для профилактики таких гемодинамических эффектов, предпочтительно вводить иммуноглобулиновый белок по изобретению, как правило, в однократной дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 100 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния, можно корректировать частоту и продолжительность лечения. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению можно вводить в начальной дозе по меньшей мере от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг или от приблизительно 10 до приблизительно 400 мг. В некоторых вариантах осуществления после начальной дозы можно осуществлять введение второй или множества последующих доз иммуноглобулинового белка или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может являться приблизительно таким же или меньшим, чем начальная доза, где последующие дозы вводят с интервалом по меньшей мере от 1 дня до 3 дней; по меньшей мере одна неделя, 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.

[0144] Известны различные системы доставки, и их можно использовать для введения фармацевтической композиции по изобретению, например, инкапсуляции в липосомах, микрочастиц, микрокапсул, рекомбинантных клеток, способных

экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu, et al., (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают, в качестве неограничивающих примеров, интрадермальный, трансдермальный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.), и ее можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может являться системным или локальным. Фармацевтическую композицию также можно вводить в везикуле, в частности, липосоме (см., например, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533).

[0145] В настоящем описании также предусмотрено использование наночастиц для доставки иммуноглобулиновых белков по изобретению. Конъюгированные с антителом наночастицы можно использовать для терапевтических и диагностических целей. Конъюгированные с антителом наночастицы и способы получения и применения подробно описаны в Arguebo, M., et al., 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" в *J. Nanomat.* Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включенной в настоящее описание в качестве ссылки. Наночастицы можно разрабатывать и конъюгировать с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для таргетинга клеток. Наночастицы для доставки лекарственных средств также описаны, например, в патентах США №№ 8257740 или 8246995, каждый из которых включен в настоящее описание в полном объеме.

[0146] В некоторых случаях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном из вариантов осуществления можно использовать насос. В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления систему с контролируемым высвобождением можно размещать вблизи мишени композиции, таким образом, будет требоваться лишь фракция системной дозы.

[0147] Инъецируемые препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутричерепных, интраперитонеальных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъецируемые препараты можно получать общеизвестными способами.

[0148] Фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в контексте подкожного введения уже используют шприц-ручку для введения фармацевтической композиции по изобретению. Такая шприц-ручка может являться многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприц-ручке, как правило, используют заменяемый картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции в картридже и опустошения картриджа пустой картридж легко можно выбрасывать и заменять новым картриджем, содержащим

фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручку можно использовать повторно. В одноразовой шприц-ручке отсутствует заменяемый картридж. Вместо этого одноразовую шприц-ручку поставляют заранее наполненной фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. После опустошения резервуара с фармацевтической композицией выбрасывают все устройство.

[0149] Преимущественно, описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального использования получают в лекарственных формах в однократной дозе, соответствующей дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в однократной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекционные препараты (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося иммуноглобулинового белка, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму в однократной дозе; в частности, в форме инъекционного препарата, предпочтительно, чтобы иммуноглобулиновый белок содержался в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 300 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 300 мг для других лекарственных форм.

Терапевтическое использование иммуноглобулиновых белков

[0150] Настоящее изобретение включает способы, включающие введение нуждающемуся в этом индивидууму, терапевтической композиции, содержащей иммуноглобулиновый белок. Терапевтическая композиция может содержать любые иммуноглобулиновые белки, представленные в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель или дилуент. В рамках изобретения выражение "нуждающийся в этом индивидуум" означает человека или неявляющегося человеком животного, которое получило бы пользу от повышения артериального давления или реверсирования эффекта введения агониста NPR1.

[0151] Иммуноглобулиновые белки по изобретению (и содержащие их терапевтические композиции), помимо прочего, можно использовать для лечения любого заболевания или нарушения, при котором благоприятным будет повышение артериального давления. В частности, иммуноглобулиновые белки по изобретению можно использовать для лечения, профилактики и/или улучшения любого заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью NPR1 или опосредованного ими. Механизм действия, посредством которого осуществляют терапевтические способы по изобретению, включает связывание с агонистическим антителом против NPR1 и удаление/клиренс агонистического антитела. Удаление агонистического антитела против NPR1 приводит к повышению артериального давления.

[0152] Иммуноглобулиновые белки по изобретению можно использовать для лечения, например, любого NPR1-ассоциированного заболевания или нарушения у индивидуума, которому вводили агониста NPR1, и где желательным является реверсирование гемодинамических эффектов агониста NPR1. Неограничивающие примеры NPR1-ассоциированного заболевания или нарушения включают гипертензию, сердечную недостаточность, ожирение, почечную недостаточность, хроническое

заболевание почек, отек желтого пятна, глаукому, инсульт, нарушения легких, легочный фиброз, воспаление, астму, нарушения скелетного роста, переломы костей, диабет и злокачественные новообразования. Введение терапевтической композиции, содержащей иммуноглобулиновый белок по изобретению, может приводить к профилактике одного или более неблагоприятных эффектов, связанных со сниженным артериальным давлением. Потенциальные нежелательные явления, ассоциированные со сниженным артериальным давлением, могут включать персистирующую, симптоматическую гипотензию, рефлекторную тахикардию в результате компенсаторных ответов симпатической нервной системы (вероятно, повышение риска инфаркта миокарда, инсульта, аритмий, сердечной недостаточности) и сниженный минутный объем кровообращения и перфузию ишемически пораженных органов у индивидуумов с нормальным (низким) венозным давлением.

[0153] В одном из вариантов осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению используют для получения фармацевтической композиции или лекарственного средства для лечения пациентов, имеющих гипотензию в результате введения антитела против NPR1. В другом варианте осуществления иммуноглобулиновые белки используют в качестве вспомогательной терапии с любым другим средством или любой другой терапией, известной специалистам в этой области, которую можно использовать для повышения артериального давления и/или устранения симптомов, ассоциированных с падением артериального давления.

[0154] Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей: (i) терапевтическое количество иммуноглобулинового белка, как представлено в настоящем описании; и (ii) агонистическое антитело против NPR1 для использования в способе для эффективной регуляции артериального давления и/или гемодинамических изменений у индивидуума, где индивидуум страдает NPR1-ассоциированным заболеванием или нарушением.

Средства обратного действия, не являющиеся иммуноглобулиновыми белками

[0155] В некоторых вариантах осуществления изобретения средство для использования в реверсировании гемодинамических эффектов антитела против NPR1 или его антигенсвязывающего фрагмента (т.е. средство обратного действия) выбрано из группы, состоящей из вазопрессора, агониста альфа-адренорецептора, стероида, антидиуретического гормона, антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF)/ингибитора ангиогенеза и низкомолекулярного средства, повышающего артериального давления.

[0156] Вазопрессор является средством, сужающим кровеносные сосуды, повышающим артериальное давление. Агонист альфа-адренорецептора (α -агонист) связывается с α -рецепторами на гладких мышцах сосудов и индуцирует их сокращение и вазоконстрикцию, повышая артериальное давление. Антидиуретический гормон является гормоном, высвобождаемым задней долей гипофиза, действующим на почки, повышая

реабсорбцию воды, вызывая вазоконстрикцию в сердечно-сосудистой системе. В этой области известны вазопрессоры и антидиуретические гормоны.

[0157] В другом варианте осуществления средство обратного действия является лекарственным средством для лечения индуцированных антителом против NPR1 гемодинамических эффектов, выбранным из группы, состоящей из, в качестве неограничивающих примеров, мидодрина, левофеда, норэпинефрина, фенилэфрина, флудрокортизона, орватена, нортеры, эфедрина, вазкулепы, дроксидопа, аковаза, биорфена, корфедра и эмерфед.

[0158] Таким образом, настоящее изобретение включает иные средства обратного действия, чем иммуноглобулиновые белки (включая антитела), которые могут реверсировать гемодинамические эффекты терапии антителом против NPR1. Например, агонист α 1-адренергического рецептора мидодрин может реверсировать эффекты R5381 в отношении артериального давления и частоты сердечных сокращений, как представлено в настоящем описании в примере 14.

Способы комбинированного лечения

[0159] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено применение иммуноглобулиновых белков и других средств обратного действия по изобретению в комбинации с одним или более другими известными гипотензивными терапевтическими средствами для регуляции артериального давления индивидуума. В конкретных вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению используют в комбинации с агонистами NPR1, предпочтительно - с антителами против NPR1. В конкретном варианте осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению используют в комбинации с R5381 для эффективной регуляции артериального давления у нуждающегося в этом индивидуума.

[0160] Способы комбинированного лечения могут включать иммуноглобулиновый белок по изобретению и любое дополнительное терапевтическое средство, которое можно успешно комбинировать с иммуноглобулиновым белком по изобретению или биологически активным фрагментом иммуноглобулинового белка по изобретению. Иммуноглобулиновые белки по изобретению можно комбинировать синергически с одним или более лекарственными средствами или способами терапии, используемыми для повышения артериального давления или регуляции эффектов, ассоциированных с падением артериального давления.

[0161] В рамках изобретения термин "в комбинации с" означает, что дополнительные терапевтически активные компоненты можно вводить до, одновременно или после введения иммуноглобулинового белка или другого средства обратного действия по изобретению. Термин "в комбинации с" также включает последовательное или одновременное введение иммуноглобулинового белка или другого средства обратного действия и второго терапевтического средства.

[0162] В конкретных вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению вводят индивидууму в комбинации с агонистами NPR1, например, R5381. В

дополнительных вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению и агонисты NPR1, например, R5381, вводят индивидууму одновременно (в одно и то же время) совместно в одной композиции или раздельно в нескольких композициях. В дополнительных вариантах осуществления иммуноглобулиновые белки по изобретению и агонисты NPR1, например, R5381, вводят индивидууму последовательно, агонисты NPR1, например, R5381, после иммуноглобулиновых белков по изобретению.

[0163] Дополнительные терапевтически активные компоненты можно вводить индивидууму перед введением иммуноглобулинового белка или другого средства обратного действия по изобретению. Например, первый компонент можно рассматривать как вводимый "перед" вторым компонентом, если первый компонент вводят за 1 неделю, 72 часа, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часа, 12 часов, 6 часов, 5 часов, 4 часа, 3 часа, 2 часа, 1 час, 30 минут или менее 30 минут до введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительные терапевтически активные компоненты можно вводить индивидууму после введения иммуноглобулинового белка или другого средства обратного действия по изобретению. Например, первый компонент можно рассматривать как вводимый "после" второго компонента, если первый компонент вводят через 30 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часа или более после введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительные терапевтически активные компоненты можно вводить индивидууму одновременно с введением иммуноглобулинового белка или другого средства обратного действия по изобретению.

[0164] В целях по изобретению "одновременное" введение включает, например, введение иммуноглобулинового белка или другого средства обратного действия и дополнительного терапевтически активного компонента индивидууму в одной лекарственной форме или в отдельных лекарственных формах, вводимых индивидууму в пределах приблизительно 30 минут или менее относительно друг друга. При введении в отдельных лекарственных формах каждую лекарственную форму можно вводить одним и тем же путем (например, иммуноглобулиновый белок или другое средство обратного действия и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно и т.д.); альтернативно, каждую лекарственную форму можно вводить другим путем (например, иммуноглобулиновый белок или другое средство обратного действия можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить перорально). В любом случае в целях по изобретению введение компонентов в одной лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах одним путем или в отдельных лекарственных формах разными путями считают "одновременным введением". В целях по изобретению введение иммуноглобулинового белка или другого средства обратного действия "до", "одновременно" или "после" (как эти термины определены в настоящем описании выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считают введением иммуноглобулинового белка или другого

средства обратного действия "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

[0165] Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых иммуноглобулиновый белок или другое средство обратного действия по изобретению составляют совместно с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано где-либо в настоящем описании.

Диагностическое применение иммуноглобулиновых белков

[0166] Резервные средства по изобретению можно использовать для детекции и/или измерения антитела против NPR1 в образце, например, для диагностических целей. Примеры диагностических анализов для антитела против NPR1 могут включать, например, приведение образца, полученного из пациента, в контакт с резервным средством по изобретению, где резервное средство метят детектируемой меткой или репортерной молекулой или используют в качестве лиганда захвата для селективного выделения антитела против NPR1 из образцов пациента. Альтернативно, немеченое резервное средство можно использовать в диагностических целях в комбинации с вторичным антителом, которое само по себе детектируемо мечено. Детектируемая метка или репортерная молекула может являться радиоактивным изотопом, таким как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентным или хемилюминесцентным остатком, таким как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или ферментом, таким как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные примеры анализов, которые можно использовать для детекции или измерения антитела против NPR1 в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и активируемую флуоресценцией сортировку клеток (FACS).

[0167] Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах антитела против NPR1 по изобретению включают любой образец ткани или жидкости, получаемый из пациента, содержащий детектируемые количества белка антитела против NPR1 или его фрагментов после его введения индивидууму. Как правило, уровни белка антитела против NPR1 в конкретном образце, полученном из здорового пациента (например, пациента, которому не вводили антитело против NPR1), будут измерять, чтобы сначала установить исходный или стандартный уровень антитела против NPR1. Затем этот исходный уровень антитела против NPR1 можно сравнивать с уровнями антителами против NPR1, измеренными в образцах, полученных из индивидуумов, у которых предполагают введение антитела против NPR1.

[0168] Иммуноглобулиновые белки, специфические для белка антитела против NPR1, могут не содержать дополнительных меток или остатков, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или остаток. В одном из вариантов осуществления метка или остаток является биотином. В анализе связывания локализация метки (если она есть) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, на которой связывается пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий

N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что С-концевая часть пептида будет дистальной относительно поверхности.

ПРИМЕРЫ

[0169] Следующие примеры приведены для предоставления специалистам в этой области полного раскрытия и описания получения и использования способов и композиций по изобретению, а не для ограничения объема того, что авторы считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но необходимо учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иначе, части являются массовыми частями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно 25°C, и давление является атмосферным или близким к нему.

Пример 1: Получение антитела человека против агонистических антител, специфически связывающихся с рецептором 1 натрийуретического пептида (NPR1)

Получение антител против R5381

[0170] Антитела человека против белка антитела против NPR1 получали с помощью мыши VELOCIMMUNE[®], содержащей ДНК, кодирующую вариabельные области тяжелой цепи и легкой цепи каппа человека иммуноглобулина. Мышей иммунизировали антителом против NPR1R5381 (описанным в других местах в настоящем описании).

[0171] Гуморальный иммунный ответ подвергали мониторингу с помощью специфического для антитела против R5381 иммунологического анализа. При достижении желаемого иммунного ответа собирали спленоциты и подвергали их слиянию с миеломными клетками мыши для сохранения их жизнеспособности и получения линий гибридомных клеток. Линии гибридомных клеток подвергали скринингу и селекции для идентификации линий клеток, продуцирующих антитела против R5381. Линии клеток использовали для получения нескольких химерных антител против R5381 (т.е. антител, имеющих вариabельные домены человека и константные домены мыши).

[0172] Антитела против R5381 также выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток мыши без слияния с миеломными клетками, как описано в патенте США № 7582298, конкретно включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Используя этот способ, получали несколько полностью человеческих антител против R5381 (т.е. антител, имеющих вариabельные домены человека и константные домены человека).

[0173] Примеры антител, полученные, как описано выше, обозначали как mAb36312 и mAb36313.

Получение "одноплечевых" антител против R5381

[0174] Выбранные антитела, полученные, как описано выше, использовали для получения моновалентных или "одноплечевых" антител или антигенсвязывающих молекул. Такие моновалентные антигенсвязывающие молекулы включают одну R5381-

связывающую часть, содержащую HCVR и LCVR. Моновалентные антитела, содержащие полноразмерную тяжелую цепь, полноразмерную легкую цепь и дополнительный полипептид Fc-домена, конструировали стандартными способами (см. WO2010151792), при этом константная область тяжелой цепи отличается от полипептида Fc-домена по меньшей мере на две аминокислоты. Такие модификации можно использовать при очистке моновалентных антител (см. WO2010151792).

[0175] Получали примеры одноплечевых антител, имеющие Fc-домен IgG4, и обозначали их как REGN9035 и REGN9037.

[0176] Биологические свойства примеров антител, полученных способами по этому примеру, подробно описаны в приведенных ниже примерах.

Пример 2: Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи

[0177] В таблице 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей и CDR тяжелой и легкой цепи выбранных антител против R5381 по изобретению.

Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей

	SEQ ID NO							
Обозначения антител	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb36312	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb36313	22	24	26	28	30	32	34	36

[0178] Идентификаторы соответствующих последовательностей нуклеиновой кислоты приведены в таблице 2.

Таблица 2: Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты

	SEQ ID NO							
Обозначения антител	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb36312	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb36313	21	23	25	27	29	31	33	35

[0179] Антитела, приведенные в настоящем описании, как правило, имеют полностью человеческие переменные области, но могут иметь константные области человека или мыши. Как будет понятно специалисту в этой области, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, можно преобразовывать в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши можно преобразовывать в антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае, переменные домены (включая CDR), указанные числовыми идентификаторами, приведенными в таблице 2, будут оставаться такими же, и ожидают, что свойства связывания с антигеном, будут идентичными или в значительной степени схожими, независимо от природы Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления

выбранные антитела с Fc IgG1 мыши преобразуют в антитела с Fc IgG4 человека. В одном из вариантов осуществления Fc-домен IgG4 содержит 2 или более изменения аминокислот, как описано в US20100331527. В одном из вариантов осуществления Fc IgG4 человека содержит мутацию серина в пролин в шарнирной области (S108P), способствующую стабилизации димера. Если не указано иначе, все антитела, используемые в следующих примерах, содержат изотип IgG4 человека.

[0180] Примером бивалентного антитела, содержащего пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2/10, является REGN6580. REGN6580 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[0181] Примером бивалентного антитела, содержащего пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 22/30, является REGN6581. REGN6581 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

[0182] Выбранные антитела против R5381 использовали в конструировании одноплечевых антител, содержащих связывающее плечо против R5381 и дополнительный полипептид Fc (или укороченную тяжелую цепь). В некоторых вариантах осуществления связывающее плечо против R5381 содержит константную область тяжелой цепи изотипов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или их варианта. В одном из вариантов осуществления дополнительный полипептид Fc принадлежит изотипу IgG1 или его варианту. В одном из вариантов осуществления дополнительный полипептид Fc принадлежит изотипу IgG4 или его варианту.

[0183] В таблицах 3А, 3В и 3С приведены идентификаторы последовательностей HCVR, LCVR, CDR и тяжелой и легкой цепи выбранных одноплечевых антител.

Таблица 3А: Аминокислотные последовательности переменных областей и CDR выбранных антител

Идентификатор антител	HCV	HCD	HCD	HCD	LCV	LCDR	LCDR	LCDR3
	R	R1	R2	R3	R	1	2	
REGN9035	2	4	6	8	10	12	14	16
REGN9037	22	24	26	28	30	32	34	36

Таблица 3В: Идентификаторы аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи выбранных антител

Идентификатор антител	Тяжелая цепь антитела против R5381	Укороченная тяжелая цепь	Легкая цепь
REGN9035	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 20
REGN9037	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 40

Таблица 3С: Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты тяжелой цепи и легкой цепи выбранных антител

		руемого аналита		(RU)				
H2aM22033 N	REGN65 80	Бивалент ный hIgG4	179±1,4	110	1,78E+0 5	9,42E- 05	5,28E- 10	123
	REGN90 35	Моновал ентный hIgG4	148±0,7	47	7,51E+0 4	1,32E- 04	1,76E- 09	87
	REGN67 12	Fab	174±0,3	60	8,50E+0 4	2,47E- 04	2,90E- 09	47
	REGN65 81	Бивалент ный hIgG4	177±0,5	65	1,27E+0 5	7,11E- 05	5,61E- 10	163
	REGN90 37	Однопле чевой hIgG4	144±0,5	31	6,51E+0 4	9,89E- 05	1,52E- 09	117
	REGN67 13	Fab	173±0,5	39	5,91E+0 4	1,66E- 04	2,81E- 09	70

Таблица 5: Параметры кинетики связывания разных mAb, связывающихся с H2aM22033N при 37°C

Захваченн ое mAb	Иньеци руемый аналит	Подробн ости констру кции иньецир уемого аналита	Урове нь захват а mAb (RU)	100 нМ связа нного Ag (RU)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (M)	t_{1/2} (ми н)
H2aM2203 3N	REGN65 80	Бивален тный hIgG4	217±0, 7	160	4,64E+0 5	4,24E- 04	9,14E- 10	27
	REGN90 35	Моновал ентный hIgG4	166±1, 6	81	1,49E+0 5	8,60E- 04	5,78E- 09	13
	REGN67 12	Fab	210±0, 4	85	2,18E+0 5	1,09E- 03	5,02E- 09	11

	REGN65 81	Бивалентный hIgG4	215±0, 6	104	3,17E+0 5	3,67E- 04	1,16E- 09	31
	REGN90 37	Одноплечевой hIgG4	158±0, 6	55	1,10E+0 5	7,38E- 04	6,71E- 09	16
	REGN67 13	Fab	209±0, 5	66	1,64E+0 5	8,09E- 04	4,95E- 09	14

Пример 4: Перекрестная конкуренция между разными антителами против R5381

[0187] Конкуренция за связывание между антителами против R5381 (mAb) определяли с использованием безмаркерного анализа интерферометрии биослоя (BLI) в реальном времени с помощью биосенсорной платформы Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент осуществляли при 25°C в буфере 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, 1 мг/мл BSA, pH 7,4 (HBS-EBT), со встряхиванием планшета со скоростью 1000 об./мин. Для оценки того, могут ли 2 mAb конкурировать друг с другом за связывание с соответствующими эпитопами на R5381, ~0,47 нм R5381 сначала захватывали на кончиках покрытых антителом против человека (АНС) биосенсоров Octet (Fortebio Inc, # 18-5064) посредством погружения кончиков биосенсоров в течение 1 минуты в лунках, содержащих 1,7 мкг/мл раствор R5381. Затем кончики биосенсоров с захваченным R5381 насыщали первым mAb против R5381 (далее обозначаемым как mAb-1) посредством погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствор mAb-1, в течение 4 минут. Затем кончики биосенсоров погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствор второго mAb против R5381 (далее обозначаемого как mAb-2), в течение 3 минут. Кончики биосенсоров промывали буфером HBS-ЕТВ после каждой стадии эксперимента. Ответ связывания в реальном времени подвергали мониторингу в течение всего эксперимента и регистрировали ответ связывания в конце каждой стадии. Сравнивали ответ связывания mAb-2 с R5381, перед этим образовавшего комплексы с mAb-1, и определяли конкурентное/неконкурентное поведение разных mAb против R5381. Наблюдали перекрестную конкуренцию между mAb против R5381.

Пример 5: pH-чувствительность антитела против R5381, связывающегося с R5381

[0188] Константы скорости диссоциации (k_d) для разных против mAb R5381 в буферах с pH 7,4, pH 6,5, pH 6,0 и pH 5,0 определяли с использованием биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в реальном времени Biacore 4000. Все исследования связывания осуществляли при 37°C с использованием четырех подвижных буферов: (i) PBS, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (PBS-T-pH 7,4), (ii) PBS, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20,

pH 6,5 (PBS-T-pH 6,5), (iii) PBS, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 6,0 (PBS-T-pH 6,0), и (iv) PBS, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 5,0 (PBS-T-pH 5,0). Поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 сначала дериватизировали посредством сопряжения по аминогруппе с антителом против Fc мыши (GE Healthcare, #BR100838) для захвата H2aM22033N (родительская гибридома R5381). Разные концентрации mAb против R5381 (100 нМ-11,11 нМ, 3-кратное серийное разведение), полученные в буфере PBS-T-pH 7,4, инъецировали при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 минут с последующей диссоциацией связанного mAb против R5381 в подвижных буферах PBS-T-pH 7,4, PBS-T-pH 6,5, PBS-T-pH 6,0 или PBS-T PBS-T-pH 5,0 в течение 10 минут.

[0189] Константы скорости диссоциации (k_d) в подвижных буферах с четырьмя pH определяли посредством аппроксимации сенсограмм связывания в реальном времени к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2,0с. Диссоциативное время полувыведения ($t_{1/2}$) вычисляли из значений k_d следующим образом:

$$t_{1/2} (\text{МИН}) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

[0190] Значения k_d и $t_{1/2}$ для выбранных mAb против R5381, связывающихся с H2aM22033N в PBS-T, pH 7,4, с последующей диссоциацией в PBS-T-pH 7,4, PBS-T-pH 6,5, PBS-T-pH 6,0 или PBS-T-pH 5,0 по изобретению при 37°C приведены в таблице 6, таблице 7, таблице 8 и таблице 9, соответственно.

Таблица 6: Связывание выбранных mAb против R5381 с H2aM22033N в буфере PBS-T-pH 7,4, и диссоциация в буфере PBS-T-pH 7,4 при 37°C

Захваченно е mAb	Инъецируе мый аналит	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанног о Ag (RU)	k_d (1/сек)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM22033 N	REGN9035	159±0,9	84	9,96E-04	12
	REGN9037	155±1	55	8,67E-04	13

Таблица 7: Связывание выбранных mAb против R5381 с H2aM22033N в буфере PBS-T-pH 7,4 и диссоциация в буфере PBS-T-pH 6,5 при 37°C

Захваченное mAb	Инъецируе мый аналит	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанног о Ag (RU)	k_d (1/сек)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM22033N	REGN9035	173±0,4	97	1,42E-03	8
	REGN9037	172±0,3	63	7,92E-04	15

Таблица 8: Связывание выбранных mAb против R5381 с H2aM22033N в буфере PBS-T-pH 7,4 и диссоциация в буфере PBS-T-pH 6,0 при 37°C

Захваченное mAb	Иньецируемый аналит	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_d (1/сек)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM22033N	REGN9035	171±0,8	95	2,94E-03	3,9
	REGN9037	168±0,4	61	8,11E-04	14

Таблица 9: Связывание выбранных mAb против R5381 с H2aM22033N в буфере PBS-T-pH 7,4 и диссоциация в буфере PBS-T-pH 5,0 при 37°C

Захваченное mAb	Иньецируемый аналит	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_d (1/сек)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM22033N	REGN9035	165±0,5	84	1,97E-02	0,6
	REGN9037	162±0,3	54	6,64E-04	17

[0191] Сравнение диссоциативного времени полувыведения ($t_{1/2}$) антиидиотипических моноклональных антител против R5381 REGN9035 и REGN9037 в буферах pH 7,4, pH 6,5, pH 6,0 и pH 5,0 показано на фигуре 1.

Пример 6: Ингибирование R5381-индуцированной активации NPR1

[0192] Для оценки регуляции NPR1 человека (hNPR1) разрабатывали стабильную линию клеток HEK293, стабильно экспрессирующую hNPR1 с С-концевой меткой мус и FLAG. Линию клеток сортировали по высокой экспрессии hNPR1, HEK293/hNPR1.МусDDK HS или сокращенно обозначаемого как HEK29/hNPR1, и поддерживали в DMEM, содержащем 10% FBS, NEAA, пенициллин/стрептомицин/глутамин и 500 мкг/мл сульфата G418. Связывание лиганда с NPR1 активирует гуанилатциклазный домен рецептора, катализирующий продукцию цГМФ из ГТФ (Zois, et al., 2014 Nature 11(7):403-412). Для оценки активности NPR1 использовали гомогенный анализ флуоресценции с временным разрешением (HTRF), в котором измеряют уровни цГМФ.

[0193] Для анализа цГМФ клетки HEK293/hNPR1 высевали в 96-луночные планшеты с половинным объемом в количестве 20000 клеток/луночку с 50 мкл полных сред для выращивания и культивировали в течение ночи. На следующий день индуцировали активацию hNPR1, заменяя среды 10 мкл буфера для разведения (OptiMEM с 0,1% FBS) с последующим добавлением 10 мкл 2-кратного агониста в диапазоне концентраций, включая образец без какого-либо агониста (см. таблицу 10 ниже), полученного в буфере для разведения. Для оценки реверсирования R5381-индуцированной активации hNPR1 клетки обрабатывали 10 мкл 2-кратного антитела против R5381 в диапазоне концентраций (см. таблицу 10), полученных в буфере для разведения, с последующим добавлением 10 мкл 70 нМ R5381, полученного в буфере для разведения в отдельности или с 40 пМ ANP или 80 пМ BNP. Обработанные клетки инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Анализ HTRF проводили с использованием набора для HTRF цГМФ от Cisbio по рекомендациям

производителя (#62GM2PEH). В кратком изложении, 20 мкл 1-кратных разведений цГМФ добавляли в пустые лунки для получения стандартной кривой цГМФ. Для измерения концентрации цГМФ в образцах с тестируемыми препаратами, 10 мкл цГМФ-d2 и 10 мкл антитела против цГМФ, конъюгированного с криплатом, разведенным в лизирующем буфере, добавляли в каждую лунку в течение 60 мин при RT в темноте. Интенсивность флуоресценции определяли с использованием многоканального спектрофотометра для чтения планшетов EnVision (возбуждение=320 нм, испускание=620 нм/665 нм, Perkin Elmer), и вычисляли соотношение резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) с использованием уравнения, приведенного ниже:

$$\text{Соотношение FRET} = \frac{\text{Сигнал при 665 нм}}{\text{Сигнал при 620 нм}} \times 100^4$$

[0194] Соотношения FRET преобразовывали в концентрации цГМФ с помощью стандартной кривой цГМФ и анализировали с использованием 4-параметрического логистического уравнения на кривой доза-эффект с 11 точками для получения значений полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) для тестируемых агонистов и значений полумаксимальной ингибиторной концентрации (IC_{50}) для тестируемых антагонистов с использованием GraphPad Prism 8. Максимальное ингибирование вычисляли с помощью приведенного ниже уравнения:

$$\% \text{ максимального ингибирования} = \frac{[\text{цГМФ, нМ}]_{70 \text{ нМ REGN5381}} - [\text{цГМФ, нМ}]_{\text{тестируемое антитело}}}{[\text{цГМФ, нМ}]_{70 \text{ нМ REGN5381}} - [\text{цГМФ, нМ}]_{\text{исходный уровень}}} \times 100\%$$

[0195] В этом уравнении $[\text{цГМФ, нМ}]_{\text{исходный уровень}}$, $[\text{цГМФ, нМ}]_{\text{тестируемое антитело}}$ и $[\text{цГМФ, нМ}]_{70 \text{ нМ R5381}}$ представляют собой значения концентрации цГМФ из клеток, обработанных буфером для разведения, наибольшую концентрацию антитела против R5381 и 70 нМ R5381 с 40 пМ ANP или 80 пМ BNP и без них, соответственно.

Таблица 10: Концентрация реагентов, используемых в анализе цГМФ NPR1

Агонист NPR1	Диапазон концентраций [нМ]
ANP	2-0,0020
BNP	4-0,0039
R5381	300-0,29
Антитело против R5381 (\pm R5381, \pm ANP или \pm BNP)	300-0,29

Результаты

[0196] R5381 активировал hNPR1, экспрессируемый в клетках HEK293/hNPR1, для стимуляции накопления цГМФ со значениями EC_{50} 1,78-31,2 нМ в присутствии или отсутствие ANP или BNP, где исходные уровни цГМФ без антитела повышались за счет постоянного количества ANP или BNP (таблица 11 ниже). Изотипический контроль, REGN1945, не демонстрировал какой-либо измеримой активации в буфере для разведения. Значения EC_{50} для ANP и BNP не вычисляли из-за предела количественного

определения при высокой концентрации по сравнению со стандартной кривой цГМФ в этом анализе.

[0197] Все одноплечевые и бивалентные антитела против R5381 блокировали индуцируемую 70 нМ R5381 активацию hNPR1 в присутствии или отсутствие 40 пМ ANP или 80 пМ BNP со значениями IC₅₀ 15,5-57,5 нМ и максимальным ингибированием 97-106% (таблица 11). Изотипический контроль, REGN1945, не демонстрировал какого-либо значимого ингибирования индуцируемой 70 нМ R5381 активации hNPR1 в присутствии или отсутствие ANP или BNP (таблица 11).

[0198] В совокупности, все антитела против R5381 демонстрировали значимое ингибирование индуцируемой R5381 активации hNPR1 в присутствии или отсутствие эндогенного лиганда, что измеряют по накоплению цГМФ.

Таблица 11. Одноплечевые и бивалентные антитела против R5381 значимо ингибировали R5381-индуцированную активацию NPR1 человека, что измеряют по накоплению цГМФ в присутствии или отсутствие эндогенного лиганда

EC ₅₀ R5381 ± лиганд, [M]	Без лиганда		ANP		BNP	
			40 пМ ANP		80 пМ BNP	
	3,12E-08		2,07E-08		1,78E-09	
Против R5381 при 70 нМ	Без лиганда		40 пМ ANP		80 пМ BNP	
	IC ₅₀ [M]	Макс. инг. (%)	IC ₅₀ [M]	Макс. инг. (%)	IC ₅₀ [M]	Макс. инг. (%)
REGN6580	1,55E-08	99	2,23E-08	102	3,32E-08	99
REGN6581	1,80E-08	100	2,06E-08	104	3,50E-08	99
REGN9035	4,60E-08	100	2,66E-08	104	4,13E-08	97
REGN9037	3,63E-08	99	1,76E-08	101	3,81E-08	97
Изотипический контроль	ND	27	ND	28	ND	6

ND: не определяли; Макс. инг.: максимальное ингибирование.

[0199] Обнаружено, что антитела против R5381 ингибируют R5381-индуцированную активацию hNPR1 в отсутствие эндогенного лиганда или в присутствии 40 пМ ANP, или 80 пМ BNP. Клетки инкубировали с увеличивающимися концентрациями ANP, BNP, R5381 или изотипическим контролем (REGN1945) в отдельности или 70 нМ R5381 в присутствии или отсутствие постоянной концентрации ANP или BNP. Интенсивность флуоресценции определяли с использованием EnVision (возбуждение=320 нм, испускание=620 нм/665 нм) и вычисляли соотношение FRET и концентрацию цГМФ, как описано в экспериментальном способе.

Пример 7. Анализ блокирования ELISA

[0200] hNPR1.ecto.mmh (аминокислоты 1-441 в котором представляют собой аминокислоты G32-E473 NPR1 человека после трансляции NM_000906.3 и аминокислоты 442-469 - метку Мус-Мус-гескагистидин; SEQ ID NO: 47) в количестве 1,0 мкг/мл в PBS наносили в качестве покрытия на 96-луночные планшеты для микротитрования и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем участки неспецифического связывания блокировали с использованием 0,5% (масс./об.) раствора BSA в PBS (буфере для анализа). mAb против R5381 и mAb изотипического контроля трехкратно серийно разводили от 500 нМ до 8,46 пМ в буфере для анализа. В 96-луночной планшете для разведения 285 пМ биотин-R5381 смешивали с трехкратно серийно разведенными антителами и позволяли им предварительно связываться при комнатной температуре (RT) в течение 1 часа. Конечные концентрации mAb против R5381 и mAb изотипического контроля находились в диапазоне от 333,33 нМ до 5,64 пМ, и конечная концентрация биотин-R5381 составляла 95 пМ. Через 1 час инкубации при RT предварительно связанную реакцию смесь переносили на планшеты для микротитрования, покрытые hNPR1.ecto.mmh. Планшеты для микротитрования инкубировали при RT в течение 1 часа, а затем промывали раствором для промывки планшетов. Связывание биотин-R5381 определяли с использованием белка поли-HRP-стрептавидин. Планшеты инкубировали с детекторным белком в течение 1 часа при RT, а затем промывали раствором для промывки планшетов. Планшеты для анализа проявляли с помощью колориметрических субстратов TMB по рекомендации производителя.

[0201] Поглощение при 450 нм для каждой лунки регистрировали и строили график как функцию концентрации антитела. Данные анализировали в программном обеспечении GraphPad Prism с использованием четырех-параметрического логистического уравнения с помощью кривой доза-эффект с 11 точками и вычисляли значения IC₅₀. Вычисленное значение IC₅₀, определенное как концентрация антитела, необходимая для снижения на 50% связывания биотин-R5381 с иммобилизованным hNPR1.ecto.mmh, использовали в качестве индикатора эффективности блокирования. Процент блокирования при наибольшей концентрации антитела против R5381 вычисляли как индикатор способности антител блокировать связывание биотин-R5381 с NPR1 относительно исходного уровня в анализе. Исходный сигнал анализа, определенный как 0% связывания биотин-R5381, определяли из результатов OD₄₅₀ нм для связывания поли-HRP-стрептавидин в лунках только с буфером для анализа. Сигнал связывания 95 пМ биотин-R5381 в отсутствие антитела против R5381 определяли как 100% связывания или 0% блокирования.

Результаты

[0202] Способность антител против R5381 блокировать связывание биотин-R5381 с NPR1 человека оценивали с использованием анализа блокирования ELISA. Результаты анализа блокирования обобщены в таблице 12 ниже. Процент блокирования, вычисленный при наибольшей тестируемой концентрации антитела (333,33 нМ), регистрировали для всех антител. REGN9035 блокировало связывание при 95 пМ биотин-R5381 с IC₅₀ [M] 2,04 нМ и демонстрировало 99,29% блокирования при наибольшей

тестируемой концентрации. REGN9037 блокировали связывание 95 пМ биотин-R5381 с IC_{50} [M] 2,40 нМ и демонстрировало 99,05% блокирования при наибольшей тестируемой концентрации.

[0203] Бивалентные антитела против R5381 REGN6580 и REGN6581 блокировали связывание 95 пМ биотин-R5381 со значениями IC_{50} [M] 381 пМ и 543 пМ, соответственно, и оба mAb демонстрировали 100% блокирования при наибольшей концентрации. mAb изотипического контроля (REGN1945) не демонстрировало какого-либо блокирования биотин-R5381 в идентичных условиях анализа.

Таблица 12: Значения IC_{50} [M] для блокирования выбранными антителами против R5381 связывания 95 пМ биотин-R5381 с hNPR1.ecto.mmh (REGN3037)

Блокирование mAb против R5381 (одноплечевое и бивалентное) связывания 95 пМ биотин-R5381 с планшетом ELISA, покрытым 1 мкг/мл hNPR1.ecto.mmh		
REGN#	IC_{50} [M]	% блокирования с помощью 333,33 нМ антитела
REGN9035	2,04E-09	99,29
REGN6580	3,81E-10	100
REGN9037	2,40E-09	99,05
REGN6581	5,43E-10	100
Изотипический контроль	Не вычисляли	Без блокирования

100% блокирования=значение OD_{450} нМ для лунок с HRP-конъюгированным вторичным белком только в буфере для анализа в (связывание без биотин-R5381)

0% блокирования=значение OD_{450} нМ для лунок с HRP-конъюгированным вторичное вторичным белком в буфере для анализа в отсутствие постоянного количества биотин-R5381 (без антитела против × R5381).

$$\text{Максимальный \% блокирования} = 100 - \frac{[\text{Экспериментальный сигнал (mAb против R5381+Биотин-R5381)} - \text{Фоновый сигнал (только буфер)}]}{[\text{Максимальный сигнал (только Биотин-R5381)} - \text{Фоновый сигнал (только буфер)}]} \times 100$$

Экспериментальный сигнал= OD_{450} связывания биотин-R5381, наблюдаемого при тестируемой концентрации антитела против R5381

Максимальный сигнал= OD_{450} связывания 95 пМ биотин-R5381 в отсутствие антитела против R5381

Фоновый сигнал= OD_{450} контрольного связывания поли-HRP-стрептавидина только в буфере для анализа

[0204] Способы на основе ELISA использовали для оценки блокирования связывания биотин-R5381 с планшетом для ELISA, покрытым hNPR1.ecto.mmh (SEQ ID NO: 47) в присутствии диапазона концентраций одноплечевыми mAb против R5381, REGN9035 и REGN9037. В качестве контролей также тестировали соответствующие

бивалентные mAb REGN6580 и REGN6581 и mAb изотипического контроля. Процент блокирования при наибольшей концентрации mAb (333,33 нМ) и значения блокирования IC₅₀ [М] mAb приведены в таблице 12 выше. Молярность [М] означает концентрацию антител для mAb.

Пример 8. Образование циркулирующих иммунных комплексов между R5381 и антителом против R5381

[0205] Вероятность образования циркулирующих иммунных комплексов (CIC) между R5381 и антителами против R5381 тестировали с использованием набора MicroVue C1q-CIC, разработанного Quidel. Этот анализ осуществляли по инструкциям производителя. Образцы антигена и антитела комбинировали в соотношениях 1:1 или 1:10 и инкубировали при 37°C в течение 30 минут для инициации образования комплексов. Затем образцы антитело-антиген, а также положительные и отрицательные контроли агрегированного под действием тепла глобина (HAGG) разводили в соотношении 1:50 на покрытых C1q тестовых планшетах. Стандарты из набора добавляли непосредственно на покрытые C1q тестовые планшеты. Затем тестовые планшеты инкубировали при RT в течение 1 часа. Несвязанные антитела, антигены или комплексы вымывали с планшетов с использованием 1-кратного промывочного буфера. На тестовые планшеты добавляли HRP-конъюгированное детекторное антитело и инкубировали при RT в течение 30 минут, после чего несвязанное HRP-конъюгированное детекторное антитело вымывали с планшетов с использованием 1-кратного промывочного буфера. На тестовые планшеты добавляли субстрат HRP и инкубировали при RT в течение 30 минут. Затем добавляли кислотный стоп-раствор для инактивации фермента HRP. Затем планшеты считывали с помощью спектрофотометра для чтения планшетов Perkin Elmer Victor X5 при 405 нМ.

[0206] Из необработанных данных вычитали фон и стандарты из набора MicroVue C1q-CIC использовали для построения линейной стандартной кривой, которую анализировали посредством линейной регрессии. Затем значения для образцов и стандартов HAGG (мкг экв./мл) вычисляли с использованием уравнения линейной регрессии.

Результаты

[0207] На каждый планшет включали контроли с высоким и низким HAGG. По инструкциям производителя любой образец со значением ниже 4,0 мкг экв./мл считают отрицательным. Потенциал R5381 к образованию CIC с антителами против R5381 исследовали с использованием набора MicroVue C1q-CIC. Результаты обобщены в таблицах 13А и 13В ниже. Указаны конечное значение и наличие CIC. CIC не определяли в любом из экспериментальных тестовых условий.

Таблица 13А: Анализ C1q-CIC

Планшет 1			
Антитело (REGN#)	Антиген (REGN#)	Конечное значение (мкг)	результат (положит./отриц.)

		экв./мл)	
1 мкМ REGN6580	100 нМ R5381	0,20	Отрицательный
100 нМ REGN6580	100 нМ R5381	0,22	Отрицательный
1 мкМ REGN9035	100 нМ R5381	0,29	Отрицательный
100 нМ REGN9035	100 нМ R5381	0,18	Отрицательный
1 мкМ изотипического контроля	100 нМ R5381	0,30	Отрицательный
100 нМ изотипического контроля	100 нМ R5381	0,31	Отрицательный
1 мкМ REGN6580	100 нМ изотипического контроля	0,16	Отрицательный
100 нМ REGN6580	100 нМ изотипического контроля	0,11	Отрицательный
1 мкМ REGN9035	100 нМ изотипического контроля	0,20	Отрицательный
100 нМ REGN9035	100 нМ изотипического контроля	0,15	Отрицательный
1 мкМ изотипического контроля	100 нМ изотипического контроля	0,17	Отрицательный
100 нМ изотипического контроля	100 нМ изотипического контроля	0,16	Отрицательный
-	100 нМ R5381	0,08	Отрицательный
-	100 нМ изотипического контроля	0,18	Отрицательный
1 мкМ REGN6580	-	0,21	Отрицательный
100 нМ REGN6580	-	0,22	Отрицательный
1 мкМ REGN9035	-	0,25	Отрицательный

100 нМ REGN9035	-	0,16	Отрицательный
1 мкМ изотипического контроля	-	0,25	Отрицательный
100 нМ изотипического контроля	-	0,20	Отрицательный
Контроль с высоким HAGG	-	23,9	
Контроль с низким HAGG	-	1,81	

Таблица 13В: Анализ C1q-C1C

Планшет 2			
Антитело (REGN#)	Антиген (REGN#)	Конечное значение (мкг экв./мл)	результат (положит./отриц.)
1 мкМ REGN6581	100 нМ R5381	0,53	Отрицательный
100 нМ REGN6581	100 нМ R5381	0,65	Отрицательный
1 мкМ REGN9037	100 нМ R5381	0,42	Отрицательный
100 нМ REGN9037	100 нМ R5381	0,64	Отрицательный
1 мкМ изотипического контроля	100 нМ R5381	0,46	Отрицательный
100 нМ изотипического контроля	100 нМ R5381	0,55	Отрицательный
1 мкМ REGN6581	100 нМ изотипического контроля	0,30	Отрицательный
100 нМ REGN6581	100 нМ изотипического контроля	0,35	Отрицательный
1 мкМ REGN9037	100 нМ изотипического контроля	0,55	Отрицательный
100 нМ REGN9037	100 нМ изотипического контроля	0,37	Отрицательный

1 мкМ изотипического контроля	100 нМ изотипического контроля	0,36	Отрицательный
100 нМ изотипического контроля	100 нМ изотипического контроля	0,41	Отрицательный
-	100 нМ R5381	0,39	Отрицательный
-	100 нМ изотипического контроля	0,36	Отрицательный
1 мкМ REGN6581	-	0,62	Отрицательный
100 нМ REGN6581	-	0,37	Отрицательный
1 мкМ REGN9037	-	0,38	Отрицательный
100 нМ REGN9037	-	0,58	Отрицательный
1 мкМ изотипического контроля	-	0,41	Отрицательный
100 нМ изотипического контроля	-	0,43	Отрицательный
Контроль с высоким HAGG	-	21,2	
Контроль с низким HAGG	-	1,92	

Пример 9. Фармакокинетическая оценка антител против R5381 у мышей NPR1^{hu/hu}

[0208] Оценку фармакокинетики двух одноплечевых антител против R5381, REGN9035 и REGN9037, и соответствующих им бивалентных родительских антител, REGN6580 и REGN6581, проводили на гуманизированных по NPR1 мышам (мышам, гомозиготных по гуманизированному аллелю NPR1, NPR1^{hu/hu}). Когорты содержали 5 мышей на тестируемое антитело. Мышам, которым вводили REGN6580 и REGN6581, вводили однократную подкожную (SC) дозу 1 мг/кг. Мышам, которым вводили REGN9035 и REGN9037, вводили однократную нормализованную SC дозу с учетом молярной эквивалентности (0,67 мг/кг) их родительским антителам. Образцы крови собирали через 6 часов и 1, 2, 3, 7, 10, 14, 21 и 30 дней после введения. Кровь перерабатывали в сыворотку и замораживали при -80°C до анализа. Концентрации тотального и функционального hIgG в сыворотке для REGN9035, REGN9037, REGN6580 и REGN6581 измеряли с использованием платформы GyroLab xPlore platform (Gyros).

[0209] В технологии Gyros используют формат аффинной элюции для автоматизированных иммунологических анализов с детекцией лазерно-индуцированной флуоресценции. Образцы наносили на компакт-диск (CD), содержащий множество радиально-расположенных нанолитровых колонок для аффинного захвата. Ток жидкости контролировали с помощью центробежных и капиллярных сил.

[0210] Для измерения концентраций тотальных и функциональных REGN9035, REGN9037, REGN6580 и REGN6581 в сыворотке специфический для тестируемого препарата биотинилированный реагент для захвата (таблица 14 ниже) добавляли на Gyrolab Bioaffy 200 CD, содержащий аффинные колонки, предварительно нагруженные покрытыми стрептавидином бусами (Dynospheres). Стандарты, используемые для калибровки (таблица 14), анализировали в концентрациях в диапазоне 0,488-2000 нг/мл. Серийные разведения образцов сыворотки подготавливали в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA). Серийные разведения стандартов подготавливали в PBS+0,5% BSA, содержащем 2% нормальной сыворотки мыши (NMS). Одиночные образцы сыворотки, разведенные в соотношении 1:50, и двойные параллели стандартов добавляли на покрытые реагентом для захвата аффинные колонки при комнатной температуре. Захваченный IgG человека определяли с использованием Alexa-647-конъюгированного моноклонального антитела мыши против IgG1/hIgG4 человека (в количестве 0,5 мкг/мл), разведенного в буфере Rxxip F (Gyros); полученный флуоресцентный сигнал регистрировали в единицах ответа (RU) с помощью устройства GyroLab xPlog. Соответствующий нижний предел количественного определения (LLOQ) анализа 0,05 мкг/мл определяли как наименьшую концентрацию на стандартной кривой, для которой образец контроля качества (QC) определяли как постоянно отклоняющийся менее чем на 25% от ожидаемой концентрации (таблица 14). Концентрации образцов определяли посредством интерполяции из стандартной кривой, построенной с использованием 4-параметрической логистической аппроксимации кривой в программном обеспечении Gyrolab Evaluator. Средние концентрации из 2 параллельных экспериментов использовали для вычисления конечных концентраций.

Таблица 14. Условия иммунологических анализов Gyros для IgG человека

Детектируемый человек	IgG	Реагент для захвата	Концентрация реагента для захвата	Стандарт
REGN9035 (тотальное)		Биотин-конъюгированное mAb мыши против константной области легкой цепи каппа человека	20 мкг/мл	REGN9035
REGN9037 (тотальное)				REGN9037
REGN6580 (тотальное)				REGN6580
REGN6581 (тотальное)				REGN6581
REGN9035 (функциональное)		Биотин-конъюгированный Fab R5381	75 мкг/мл	REGN9035

REGN9037 (функциональное)			REGN9037
REGN6580 (функциональное)			REGN6580
REGN6581 (функциональное)			REGN6581

Fab, связывающий фрагмент антитела

[0211] Параметры ПК определяли посредством некомпартментного анализа (NCA) с использованием программного обеспечения Phoenix[®]WinNonlin[®] версии 6.3 (Certara, L.P., Princeton, NJ) и модели внесосудистого введения. Используя соответствующие средние значения концентрации (тотальный hIgG) для каждого антитела, определяли все параметры ПК, включая наблюдаемую максимальную концентрацию в сыворотке (C_{max}), расчетное время полувыведения ($t_{1/2}$), площадь под кривой концентрация-время до последней измеримой концентрации (AUC_{last}) и скорости выведения антитела (Cl), с использованием линейного правила трапеций с линейной интерполяцией и однородным приписыванием весов.

Результаты

[0212] После введения SC 1 мг/кг (или эквивалента дозы) Ab против R5381 мышам NPR1^{hu/hu} REGN9035, REGN9037, REGN6580 и REGN6581 демонстрировали схожие нормализованные по дозе максимальные концентрации тотального hIgG в сыворотке ($C_{max/D}=10,3, 9,23, 9,3$ и $11,4$ мг/мл, соответственно). Кроме того, REGN9035, REGN9037, REGN6580 и REGN6581 также демонстрировали схожее время полувыведения значения ($T_{1/2}=18,1, 17,1, 16,1$ и $15,4$ дней, соответственно), нормализованные по дозе значения воздействия лекарственного средства ($AUC_{last/D}=204, 174, 165$ и 205 (дни*мг/мл)/(мг/кг), соответственно) и скорости выведения ($Cl=5,0, 6,1, 4,9,$ и $3,7$ мл/сутки/кг, соответственно). Кроме того, концентрации тотального и функционального IgG человека для REGN9035, REGN9037, REGN6580 и REGN6581 являлись сравнимыми во всех измеряемых временных точках. Не наблюдали измеримых различий профилей ПК одноплечевых антител REGN9035 и REGN9037 по сравнению с соответствующими бивалентными антителами REGN6580 и REGN6581 у мышей NPR1^{hu/hu}.

[0213] Данные для концентраций тотального и функционального антитела обобщены в таблице 15 ниже, средние параметры ПК приведены в таблице 16 ниже, и средние концентрации тотального антитела относительно времени приведены на фигуре 2.

Таблица 15: Средние концентрации в сыворотке (\pm SEM) тотального и функционального hIgG после однократной подкожной инъекции 1 мг/кг (или эквивалента дозы) антител REGN9035, REGN9037, REGN6580 или REGN6581 у мышей NPR1^{hu/hu} с течением крови

		Концентрация тотального hIgG	Концентрация функционального hIgG
--	--	------------------------------	-----------------------------------

		1 мг/кг (нормализованная доза 0,67 мг/кг)			
Антитело	Время (день)	Среднее (мкг/мл)	± SEM	Среднее (мкг/мл)	± SEM
REGN903 5	0,25	2,2	0,18	2,2	0,17
	1	6,5	0,25	6,3	0,24
	2	6,8	0,23	7,4	0,29
	3	6,7	0,17	7,0	0,24
	7	5,9	0,27	5,9	0,25
	10	5,2	0,26	5,1	0,26
	14	3,9	0,71	3,8	0,76
	21	2,9	0,70	2,8	0,70
	30	1,9	0,49	1,8	0,44
REGN903 7	0,25	1,8	0,18	1,7	0,16
	1	6,2	0,26	5,5	0,13
	2	6,2	0,14	5,7	0,08
	3	5,9	0,32	5,5	0,21
	7	5,1	0,15	4,8	0,05
	10	4,5	0,05	4,2	0,09
	14	4,2	0,18	3,7	0,10
	21	3,0	0,10	2,8	0,10
	30	2,0	0,14	1,7	0,13
REGN658 0	0,25	1,6	0,20	1,7	0,21
	1	7,5	0,30	7,8	0,56
	2	9,0	0,45	8,6	0,40
	3	8,6	0,53	8,4	0,48
	7	7,5	0,52	7,0	0,50
	10	6,7	0,56	6,4	0,53
	14	6,1	0,56	5,6	0,50
	21	4,6	0,57	4,3	0,55
	30	2,2	0,57	2,1	0,55
REGN658 1	0,25	2,4	0,38	2,4	0,36
	1	9,7	0,68	9,4	0,60
	2	11,2	0,66	10,7	0,39
	3	10,6	0,47	9,9	0,53

	7	9,3	0,56	8,1	0,52
	10	8,4	0,37	7,4	0,45
	14	7,2	0,38	6,6	0,37
	21	5,3	0,39	4,8	0,31
	30	3,0	0,32	2,9	0,32

Сокращения: Время=время в днях после инъекции однократной дозы; день=день исследования; SEM=стандартная ошибка среднего. Параметры PK получали из профилей средней концентрации относительно времени для концентраций тотального hIgG. $T_{1/2}$ и AUC_{last} основаны на концентрациях до дня 30. Среднее значение \pm SEM для каждого параметра PK приведено для всех групп доз.

Таблица 16: Фармакокинетические параметры

Параметр	Единицы	1 мг/кг (нормализованная доза 0,67 мг/кг)			
		REGN9035	REGN9037	REGN658 0	REGN658 1
C_{max}	мкг/мл	6,9 \pm 0,2	6,5 \pm 0,2	9,3 \pm 0,5	11,4 \pm 0,7
$C_{max/D}$	мкг/мл/мг/кг	10,3 \pm 0,3	9,23 \pm 0,5	9,3 \pm 0,5	11,4 \pm 0,7
$T_{1/2}$	дни	18,1 \pm 1,1	17,1 \pm 1,2	16,1 \pm 2,3	15,4 \pm 1,1
AUC_{last}	дни*мкг/мл	136 \pm 4	117 \pm 3,1	165 \pm 19	205 \pm 11
$AUC_{last/D}$	(дни*мкг/мл)/(мг/кг)	204 \pm 5,9	174 \pm 4,6	165 \pm 19	205 \pm 11
Cl	мл/сутки/кг	5,0 \pm 0,3	6,1 \pm 0,3	4,9 \pm 1,0	3,7 \pm 0,3

Сокращения: AUC_{last} =площадь под кривой от времени введения до последней измеримой концентрации; $AUC_{last/D}$ =AUC последней дозы, нормализованная по дозе 1 мг/кг; $t_{1/2}$ =конечное время полувыведения; C_{max} =пиковая концентрация; $C_{max/d}$ =доза C_{max} , нормализованная по дозе 1 мг/кг; Cl=скорость выведения антитела с течением времени; SEM=стандартная ошибка среднего.

Пример 10. Анализ концентрации в сыворотке тотального R5381 (mAb против NPR1) после резервной терапии с помощью антител против R5381

[0214] При анализе концентрации образца в сыворотке из исследования *in vivo* оценивали эффективность бивалентных mAb против R5381 REGN6580 и REGN6581 по сравнению с антителом изотипического контроля, REGN1945, в реверсировании эффектов снижения артериального давления R5381. Исследование проводили на телеметрически измеряемых нормотензивных мышах, гуманизированных по NPR1 (мышам, гомозиготных по гуманизированному аллелю NPR1, NPR1^{hu/hu}). В кратком изложении, когорты включали 5 мышей на тестируемое антитело. Всем мышам вводили однократную подкожную (SC) дозу 5 мг/кг R5381. Через три дня мышам вводили однократную внутривенную (IV) дозу 50 мг/кг REGN6580, REGN6581 или антитело изотипического контроля REGN1945. Образцы крови собирали через 7 и 22 дней после начального

введения R5381. Кровь перерабатывали в сыворотку и замораживали при -80°C до последующего анализа. Концентрации тотального R5381 в сыворотке измеряли с использованием платформы GyroLab xPlore (Gygos).

[0215] В технологии Gygos используют формат аффинной элюции для автоматизированных иммунологических анализов с детекцией лазерно-индуцированной флуоресценции. Образцы наносили на компакт-диск (CD), содержащий множество радиально-расположенных нанолитровых колонок для аффинного захвата. Ток жидкости контролировали с помощью центробежных и капиллярных сил.

[0216] Для измерения концентрации тотального R5381 в сыворотке проводили иммунологический анализ. Мышам вводили R5381 с последующим введением mAb против R5381, которое, как предполагают, образуют комплексы антитело:антиидиотипическое антитело в сыворотке (R5381: REGN6580 или R5381: REGN6581). Для точного измерения концентраций тотального антитела R5381 в этих образцах осуществляли стадию диссоциации в начале анализа. В кратком изложении, для измерения тотального R5381 специфическое для тестируемого препарата биотинилированный реагент для захвата REGN6712 в концентрации 75 мкг/мл предварительно инкубировали в течение 4 часов при 37°C с образцами сыворотки, разведенными в соотношении 1:250, или стандартами, разведенными в концентрациях в диапазоне от 0,244 до 1000 нг/мл. Разведения образцов сыворотки подготавливали в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) (+ реагент для захвата), и серийные разведения стандартов (R5381) подготавливали в PBS+0,5% BSA, содержащем 0,4% нормальной сыворотке мыши (NMS) (+ реагент для захвата). После 4-часовой предварительной инкубации при 37°C реагентов для захвата с образцами или стандартами, разведенные одиночные образцы сыворотки (+реагент для захвата) и разведенные двойные параллели стандартов (+ реагент для захвата) добавляли на Gyrolab Bioaffy 200 CD, содержащий аффинные колонки, предварительно нагруженные покрытыми стрептавидином бусами (Dynospheres). Захваченный IgG человека определяли с использованием 0,5 мкг/мл Alexa-647-конъюгированного моноклонального антитела мыши против IgG1/hIgG4 человека, разведенного в буфере Rexas F (Gygos); полученный флуоресцентный сигнал регистрировали в единицах ответа (RU) с помощью устройства GyroLab xPlore. Соответствующий нижний предел количественного определения (LLOQ) 0,1 мкг /мл определяли как наименьшую концентрацию на стандартной кривой, для которой образец контроля качества (QC) (R5381: REGN6580, R5381: REGN6581) определяли как постоянно отклоняющийся менее чем на 25% от ожидаемой концентрации.

[0217] Для измерения концентраций тотального R5381 в сыворотке мышей, которым вводили R5381, а затем несвязывающееся контрольное антитело (REGN1945), стадия диссоциации не являлась необходимой. Концентрации тотального R5381 измеряли следующим образом. В кратком изложении, специфический для тестируемого препарата биотинилированный реагент для захвата mAb36313 в количестве 50 мкг/мл добавляли на

Gyrolab Bioaffy 200 CD, содержащий аффинные колонки, предварительно нагруженные покрытыми стрептавидином бусами (Dynospheres), при комнатной температуре. Стандарт (R5381), используемый для калибровки в этом анализе, разбавляли в концентрациях в диапазоне от 0,488 до 2000 нг/мл. Серийные разведения стандартов подготавливали в PBS+0,5% BSA, содержащем 1% нормальной сыворотки мыши (NMS). Одиночные образцы сыворотки, разведенные в соотношении 1:100, и двойные параллели стандартов добавляли на покрытые реагентом для захвата аффинные колонки при комнатной температуре. Захваченный IgG человек определяли с использованием 0,5 мкг/мл Alexa-647-конъюгированного моноклонального антитела мыши против IgG1/hIgG4 человека, разведенного в буфере Rexas F (Gyros); полученный флуоресцентный сигнал регистрировали в RU с помощью устройства GyroLab xPlore. Соответствующий LLOQ анализа 0,05 мкг /мл определяли как наименьшую концентрацию на стандартной кривой, для которой образец QC определяли как постоянно отклоняющийся менее чем на 25% от ожидаемой концентрации.

[0218] Концентрации образцов определяли посредством интерполяции из стандартной кривой, построенной с использованием 4-параметрической логистической аппроксимации кривой в программном обеспечении Gyrolab Evaluator. Средние концентрации из 2 параллельных экспериментов использовали для вычисления конечных концентраций.

Вычисление средних концентраций

[0219] Отдельные и средние концентрации ниже LLOQ (<LLOQ) регистрируют как концентрации ниже предела количественного определения (BLQ). Если >50% отдельных значений представляют собой BLQ, среднее значение для этой временной точки регистрируют как BLQ. Если ≤50% отдельных значений в исследуемой группе представляют собой BLQ, и при использовании нуля как значения BLQ среднее значение арифметически представляет собой BLQ, то среднее значение регистрируют как BLQ. Если ≤50% отдельных значений в исследуемой группе представляют собой BLQ, и при использовании нуля в качестве значений BLQ, среднее значение арифметически представляет собой ≥LLOQ, то регистрируют это арифметическое значение.

Результаты

[0220] Через семь после введения 5 мг/кг R5381 мышам NPR1^{hu/hu} с последующим введением через три дня 50 мг/кг реагентов для резервной терапии REGN6580, REGN6581 или mAb изотипического контроля (REGN1945) наблюдали более низкие средние концентрации тотального R5381 у мышей, которым вводили антиидиотипические антитела, по сравнению с мышами, которым вводили дозу изотипического контроля. Это свидетельствует о том, что антиидиотипические антитела REGN6580 и REGN6581 отвечали за более быстрый клиренс R5381, наблюдаемый у мышей, которым вводили эти антиидиотипические mAb, по сравнению с мышами, которым вводили изотипический контроль.

[0221] Мыши, которым вводили R5381 и через три дня (7 дней после исходного введения R5381) дозу REGN6580 или REGN6581, имели концентрации тотального R5381 3,6 или 7,4 мкг/мл, соответственно. Для сравнения, у мышей, которым вводили через 3 дня изотипический контроль, наблюдали концентрации тотального R5381 30,5 мкг/мл. Анализ сыворотки, полученной через 22 дня после введения R5381 с последующим введением антиидиотипических антител, показал недетектируемые концентрации тотального R5381, в то время как концентрации тотального R5381 в сыворотке в группе, которой вводили изотипический контроль, все еще составляли приблизительно 6 мкг/мл.

[0222] Обобщенные данные о концентрациях тотального R5381 в сыворотке мышей, которых подвергали IV введению REGN6580, REGN6581 или изотипического контроля REGN1945, приведены в таблице 17 ниже.

Таблица 17: Средние концентрации в сыворотке (\pm SEM) тотального IgG после однократной подкожной инъекции 5 мг/кг R5381 с последующей однократной внутривенной инъекции 50 мг/кг антиидиотипических антител REGN6580 или REGN6581 или изотипического контроля через три дня у мышей NPR1^{hu/hu} в дни 7 и 22

Группа антитела	Время (дни)	Концентрация тотального hIgG	
R5381+REGN6580		Тотальное R5381	
		Среднее (мкг/мл)	\pm SEM
	7	3,6	0,4
	22	BLQ	NA
R5381+REGN6581		Тотальное R5381	
		Среднее (мкг/мл)	\pm SEM
	7	7,4	2,7
	22	BLQ	NA
R5381+изотипический контроль		Тотальное R5381	
		Среднее (мкг/мл)	\pm SEM
	7	30,5	3
	22	5,9	2,8

Сокращение: время, время в днях после инъекции однократной дозы; дни, день исследования; BLQ, ниже предела количественного определения; NA, неприменимо; SEM=стандартная ошибка среднего

Пример 11. Оценка реверсирования R5381-индуцированного снижения артериального давления с использованием однократной внутривенной дозы 50 мг/кг бивалентных mAb против R5381 у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}

[0223] Для оценки эффектов бивалентных антител против R5381 при реверсировании снижения артериального давления, индуцированного R5381, у телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}, самцам мышей NPR1^{hu/hu}

(n=20) возрастом ~18-20 недель имплантировали телеметрические передатчики RA-C10 (DSI, St. Paul, MN) и позволяли им восстанавливаться в течение по меньшей мере 7 дней. Животных стратифицировали по группам (группы 1-4) на основе систолического артериального давления и массы тела до исследования. Животных держали по отдельности в стандартных условиях (температуры от 64°F до 84°F (от 18°C до 29°C); относительная влажность от 30% до 70%) и поддерживали цикл 12 часов освещения/12 часов темноты. Пищу (стандартный гранулированный корм исследовательской категории) и воду предоставляли свободно.

[0224] Тестируемые белки вводили соответствующим животным посредством однократной подкожной инъекции в день 0. Резервные средства вводили соответствующим животным посредством однократной внутривенной инъекции в день 3. Объем дозы для каждого животного основан на последнем по времени измерении массы тела.

Таблица 18: Дозы и группы доз

№ группы	Тестируемый препарат	Доза (мг/кг s.c.)	Резервный препарат	Доза (мг/кг i.v.)	Количество животных
					Самцы
1	PBS	0	PBS	0	5
2	REGN5381	5	mAb изотипического контроля IgG4P	50	5
3			REGN6580		5
4			REGN6581		5

[0225] Систолическое давление, диастолическое давление, пульсовое давление, среднее артериальное давление и частоту сердечных сокращений собирали в течение 10 секунд каждые 10 минут в течение периода тестирования. Данные группировали и оценивали таким образом для острого (почасовое группирование) и хронического (24-часовое группирование) реверсирования R5381-индуцированного снижения артериального давления. Концентрации циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в день 21/22 в моче анализировали посредством ELISA. Общую абсолютную и относительную массу сердца получали при некропсии. Все данные приведены как среднее \pm SEM.

Результаты

[0226] Скрининг *in vivo* бивалентных антител против R5381 REGN6580 и REGN6581 показал быстрое и постоянное реверсирование эффектов снижения артериального давления R5381 (фигура 3). REGN6580 и REGN6581 при внутривенном введении через 3 дня после начального введения R5381 могли повышать давление обратно к исходным уровням. Начальное падение давления на 6-8 мм рт.ст. (таблица 19 ниже) по

сравнению с совпадающими по времени контролями реверсировалось в пределах 3 дней после введения REGN6580 или REGN6581 (фигура 3).

Таблица 19: День 1-2 - среднее артериальное давление и частоты сердечных сокращений перед введением резервного средства

Группа	Тестируемый препарат:	Систолическое давление (мм рт.ст.)	Диастолическое давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериальное давление (мм рт.ст.)	Частота сердечных сокращений (уд./мин)
1	PBS	129±1	96±1	33±0	114±1	600±7
2	R5381	123±0**	97±1	26±0***	111±1	629±3*
3		121±0***	92±0*	28±0***	107±0**	629±1*
4		121±1***	94±1	27±0***	108±1**	593±8

Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей $NPR1^{hu/hu}$ рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг агонистического mAb против $NPR1$ R5381 или PBS, как показано в таблице 18. Все значения представляют собой среднее \pm SEM, n=4-5 на группу. Статистический анализ - односторонний ANOVA с критерием Даннета; *p<0,05 vs. PBS; **p<0,01 vs. PBS; ***p<0,001 vs. PBS.

[0227] Устойчивость реверсирования поддерживали в течение 22 дней исследования со статистически значимыми различиями по всем гемодинамическим параметрам у животных, которым вводили REGN6580 или REGN6581, по сравнению с животными, которым вводили R5381 и mAb изотипического контроля (таблица 20 ниже).

Таблица 20: День 4-20 - среднее артериальное давление и частоты сердечных сокращений после введения резервного средства

Группа	Тестируемый препарат	Резервный препарат	Систолическое давление (мм рт.ст.)	Диастолическое давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериальное давление (мм рт.ст.)	Частота сердечных сокращений (уд./мин)
1	PBS	PBS	132±0** **	97±0** **	35±0*** *	115±0*** *	567±4**
2	R5381	mAb изотипического	122±0	93±0	29±0	108±0	582±4

		контроль					
3		REGN6580	128±0**	95±1*	33±1***	112±0***	582±3
4		REGN6581	129±0**	97±0**	33±0***	114±0***	562±2***

Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей $NPR1^{hu/hu}$ рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг агонистического mAb против $NPR1$ R5381 или PBS в день исследования 0, а затем mAb изотипического контроля или против R5381 в день исследования 3, как показано в таблице 18. Все значения представляют собой среднее \pm SEM, $n=4-5$ на группу. Статистический анализ - односторонний ANOVA с критерием Даннета; * $p<0,05$ vs. изотипический контроль; ** $p<0,01$ vs. изотипический контроль; *** $p<0,001$ vs. изотипический контроль; **** $p<0,0001$ vs. изотипический контроль.

[0228] При сравнении с контрольными животными, которым вводили PBS, не наблюдали статистически значимых различий (таблица 20, фигуры 3-6) после введения REGN6580 или REGN6581, что свидетельствует о полном и постоянном реверсировании эффектов R5381-индуцированного снижения артериального давления.

[0229] Бивалентные антитела против R5381 REGN6580 и REGN6581 уменьшали снижение относительной массы сердца, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий массы сердца к массе большеберцовой кости в группе, которой вводили средство обратного действия, по сравнению с животными, которым вводили PBS (таблица 21 ниже).

Таблица 21: Общая и относительная масса сердца после введения средства обратного действия

Группа	Масса сердца (мг)	Масса головного мозга (мг)	Длина большеберцовой кости (мм)	Масса сердца: масса головного мозга	Масса сердца: длина большеберцовой кости
PBS+PBS	148±4	493±11	17,6±0,2	300±10	8,4±0,1
R5381+mAb изотипического контроля	133±4	473±20	18,2±0,2	280±9	7,3±0,2**
R5381+REGN6580	137±2	463±5	17,4±0,2	296±5	7,9±0,1

R5381+REGN658	138±4	458±12	17,8±0,2	302±12	7,8±0,2
1					

Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей $NPR1^{hu/hu}$ рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг агонистического mAb против $NPR1$ R5381 или PBS в день исследования 0, а затем mAb изотипического контроля или против R5381 в день исследования 3, как показано в таблице 18. Все значения представляют собой среднее $\pm SEM$, $n=4-5$ на группу. Статистический анализ - односторонний ANOVA с критерием Тьюки; $**p<0,01$ vs. PBS.

[0230] Не наблюдали эффекта в отношении объема мочи в случае любого из тестируемых препаратов или резервных препаратов, которые вводили (таблица 22 ниже).

Таблица 22: День 22 - объемы мочи и уровни цГМФ в моче

Группа	Тестируемый препарат	Средство обратного действия	Объем мочи (мл/сутки)г)	цГМФ в моче (пмоль/мл)	цГМФ в моче (пмоль/сутки)
1	PBS	PBS	2,1±0,1*	6568±1143	13474±2678
2	R5381 (5 мг/кг)	Изотипического контроля (50 мг/кг)	1,0±0,2	6855±937	6809±457
3		REGN6580 (50 мг/кг)	1,4±0,2	6389±1824	9009±3548
4		REGN6581 (50 мг/кг)	1,4±0,3	4715±907	7341±2549

Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей $NPR1^{hu/hu}$ рандомизировали в четыре группы с равной массой тела и подвергали однократной подкожной инъекцией R5381 с последующим введением средства обратного действия в дозах, приведенных в таблице 18. Мочу собирали в течение ночи, начиная со дня исследования 21 и заканчивая в день исследования 22. Все значения представляют собой среднее $\pm SEM$, $n=3-5$ на группу. Статистический анализ - односторонний ANOVA с критерием Даннета; $*p<0,05$ vs. группа 2 R5381+изотипический контроль).

[0231] На продукцию цГМФ не влияло введение средств обратного действия при оценке в моче в дозе 22 (таблица 22).

[0232] Бивалентные антитела против R5381 REGN6580 и REGN6581 быстро и устойчиво реверсировали эффекты снижения артериального давления R5381 до дня исследования 21 после однократной внутривенной инъекции в день исследования 3 нормотензивным мышам $NPR1^{hu/hu}$, которым вводили однократную дозу R5381.

Пример 12. Оценка реверсирования R5381-индуцированного снижения артериального давления с использованием однократной подкожной дозы 50 мг/кг бивалентных mAb против R5381 у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}

[0233] Для оценки эффектов бивалентных антител против R5381 в отношении реверсирования снижения артериального давления, индуцированного R5381, у телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}, самцам мышей NPR1^{hu/hu} (n=20) возрастом ~10-12 недель имплантировали телеметрические передатчики PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) и позволяли им восстанавливаться в течение по меньшей мере 7 дней. Животных стратифицировали по группам (группам 1-4) с учетом систолического артериального давления и массы тела до исследования. Животных по отдельности держали housed в стандартных условиях (температуры от 64°F до 84°F (от 18°C до 29°C); относительная влажность от 30% до 70%) и поддерживали цикл 12 часов освещения/12 часов темноты. Пищу (стандартный гранулированный корм исследовательской категории) и воду предоставляли свободно.

[0234] Тестируемые белки вводили соответствующим животным посредством однократной подкожной инъекции в день 0. Резервные средства вводили соответствующим животным посредством однократной внутривенной инъекции в день 3. Объем дозы для каждого животного основан на последнем по времени измерении массы тела.

Таблица 23: Дозы и группы доз

№ групп	Тестируемый препарат	Доза (мг/кг s.c.)	Резервный препарат	Доза (мг/кг s.c.)	Количество животных
					Самцы
1	PBS	0	PBS	0	5
2	REGN5381	5	mAb изотипического контроля IgG4P	50	5
3			REGN6580		5
4			REGN6581		5

[0235] Систолическое давление, диастолическое давление, пульсовое давление, среднее артериальное давление и частоту сердечных сокращений собирали в течение 10 секунд каждые 10 минут в течение периода тестирования. Данные группировали и оценивали таким образом для острого (почасовое группирование) и хронического (24-часовое группирование) реверсирования R5381-индуцированного снижения артериального давления. Концентрации циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в день 21/22 в моче анализировали посредством ELISA. Все данные приведены как среднее \pm SEM.

Результаты

[0236] Скрининг in vivo бивалентных антител против R5381 показал постоянное реверсирование эффектов снижения артериального давления R5381 (фигура 7 и таблица 24 ниже).

Таблица 24: День 1-2 - среднее артериальное давление и частоты сердечных сокращений перед введением резервного средства

Группа	Тестируемый препарат:	Систолическое давление (мм рт.ст.)	Диастолическое давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериальное давление (мм рт.ст.)	Частота сердечных сокращений (уд./мин)
1	PBS	126±1	91±0	34±1	109±1	522±5
2	R5381	118±0**	90±0	28±0**	104±0	538±7
3		118±1**	91±1	27±1***	105±1	539±10
4		119±1*	92±2	28±0**	106±1	521±11

Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей $NPR1^{hu/hu}$ рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг агонистического mAb против $NPR1$ R5381 или PBS, как показано в таблице 23. Все значения представляют собой среднее \pm SEM, $n=4-5$ на группу. Статистический анализ - односторонний ANOVA с критерием Даннета; * $p<0,05$ vs. PBS; ** $p<0,01$ vs. PBS; *** $p<0,001$ vs. PBS.

[0237] REGN6580 и REGN6581 при подкожном введении через 3 дня после исходного введения R5381 могли повышать давление обратно до исходных уровней (фигура 7 и таблица 25 ниже).

Таблица 25: День 4-20 - среднее артериальное давление и частоты сердечных сокращений после введения резервного средства

Группа	Тестируемый препарат	Резервный препарат	Систолическое давление (мм рт.ст.)	Диастолическое давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериальное давление (мм рт.ст.)	Частота сердечных сокращений (уд./мин)
1	PBS	PBS	130±1** **	95±0** **	35±0****	113±1** **	523±4
2	R5381	mAb изотипического	116±0	88±0	28±0	102±0	524±3

		контроль					
3		REGN6580	126±1**	92±0**	34±0****	109±1**	501±3****
4		REGN6581	127±1**	93±1**	34±0****	111±1**	494±4****

Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей $NPR1^{hu/hu}$ рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг агонистического mAb против $NPR1$ R5381 или mAb изотипического контроля, как показано в таблице 23. Все значения представляют собой среднее $\pm SEM$, $n=4-5$ на группу. Статистический анализ - односторонний ANOVA с критерием Даннета; **** $p < 0,0001$ vs. изотипический контроль.

[0238] Устойчивость реверсирования поддерживали в течение 22 дней исследования со статистически значимыми различиями по всем гемодинамическим параметрам у животных, которым вводили REGN6580 или REGN6581, по сравнению с животными, которым вводили R5381 и mAb изотипического контроля (фигура 7 и таблица 25). При сравнении с контрольными животными, которым вводили PBS, не наблюдали статистически значимых различий (таблица 25, фигура 7) после введения REGN6580 или REGN6581, что свидетельствует о полном и устойчивом реверсировании эффектов R5381-индуцированного снижения артериального давления.

[0239] REGN6580 и REGN6581 демонстрировали снижение передачи сигнала $NPR1$, о чем свидетельствует статистически значимое снижение уровней цГМФ в моче после подкожного введения REGN6580 или REGN6581 через 22 дня (таблица 26 ниже).

Таблица 26: День 22 - объемы мочи и уровни цГМФ в моче

Группа	Тестируемый препарат:	Средство обратного действия	Объем мочи (мл/сутки)г	цГМФ в моче (пмоль/мл)	цГМФ в моче (пмоль/сутки)
1	PBS	PBS	1,3±0,2	2699±223*	3844±969*
2	R5381 (5 мг/кг)	Изотипический контроль (50 мг/кг)	1,7±0,2	6781±2079	11500±3795
3		REGN6580 (50 мг/кг)	1,1±0,1	2932±435*	3312±738*
4		REGN6581 (50 мг/кг)	1,9±0,5	3165±370**	6305±2367

Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей $NPR1^{hu/hu}$ рандомизировали в четыре группы с равной массой тела и подвергали однократной подкожной инъекции R5381 с последующим подкожным введением средства обратного действия в дозе, приведенной в таблице 23. Мочу собирали в течение ночи, начиная со дня исследования 21

и заканчивая в день исследования 22. Все значения представляют собой среднее \pm SEM, $n=3-5$ на группу. Статистический анализ - односторонний ANOVA с критерием Даннета; $*p<0,05$ vs. группа 2 R5381+изотипический контроль).

[0240] Демонстрирующее тенденцию, но статистически незначимое снижение абсолютной и относительной массы сердца наблюдали в случае введения R5381 и изотипического контроля (таблица 27 ниже).

Таблица 27: Общая и относительная масса сердца после введения средства обратного действия

Группа	Масса сердца (мг)	Масса головного мозга (мг)	Длина большеберцовой кости (мм)	Масса сердца: масса головного мозга	Масса сердца: длина большеберцовой кости
PBS+P BS	126 \pm 8	427 \pm 7	17,6 \pm 0,2	0,294 \pm 0,015	0,007 \pm 0,0004
R5381+ mAb изотипический контроль	120 \pm 15	442 \pm 3	18,0 \pm 0,1	0,271 \pm 0,032	0,007 \pm 0,0009
R5381+ REGN6 580	126 \pm 8	437 \pm 4	17,8 \pm 0,2	0,288 \pm 0,018	0,007 \pm 0,0004
R5381+ REGN6 581	126 \pm 6	452 \pm 7	17,9 \pm 0,2	0,280 \pm 0,012	0,007 \pm 0,0004

Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг агонистического mAb против NPR1 R5381 или изотипического контроля, как показано в таблице 23. Все значения представляют собой среднее \pm SEM, $n=4-5$ на группу. Статистический анализ - односторонний ANOVA с критерием Даннета.

[0241] Это изменение, вероятно, можно приписать гемодинамическим эффектам R5381. Хотя это было и незначимо, животные, которым вводили R5381, а затем REGN6580 или REGN6581, имели абсолютную и относительную массу сердца, близкую к

контрольным животным, что соответствует уменьшению R5381-индуцированных гемодинамических эффектов.

[0242] После однократной подкожной инъекции в день исследования 3 бивалентный антитела против R5381 REGN6580 и REGN6581 быстро и устойчиво реверсировали эффекты снижения артериального давления R5381, что оценивали у телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Оба средства также действовали, ингибируя NPR1-индуцированную продукцию цГМФ до дня исследования 22.

Пример 13. Оценка реверсирования R5381-индуцированного снижения артериального давления с использованием однократной дозы 50 мг/кг моновалентных mAb против R5381 у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}

[0243] Для оценки эффектов моновалентных антител против R5381 в отношении реверсирования снижения артериального давления, индуцированного R5381, у телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}, самцам мышей NPR1^{hu/hu} (n=48) возрастом ~13-14 недель имплантировали телеметрические передатчики PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) и позволяли восстанавливаться в течение по меньшей мере 7 дней. Животных стратифицировали в группы (таблица 28 ниже) (группы 1-8) с учетом систолического артериального давления и массы тела до исследования (таблица 29 ниже).

Таблица 28: Дозы и группы доз

№ группы	Тестируемый препарат	Доза (мг/кг s.c.)	Резервный препарат	Доза резервного препарата (мг/кг)	Путь введения резервного препарата	Количество животных	
						Самцы	
1	PBS	0	PBS	0	i.v.	6	
2	REGN5381	5	mAb изотипического контроля IgG4P	50	s.c.	6	
3			REGN6580				6
4			REGN9035				6
5			REGN9037				i.v.
6			REGN6580		6		
7			REGN9035		6		
8			REGN9037		6		

Таблица 29: День 1-2 - среднее артериальное давление и частоты сердечных сокращений перед введением резервного средства

Группа	Тестируемый препарат	Систолическое давление (мм рт.ст.)	Диастолическое давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериальное давление (мм рт.ст.)	Частота сердечных сокращений (уд./мин)
1	PBS	123±0	89±0	34±0	107±0	545±5
2	R5381	120±0***	90±0	30±0***	106±0*	582±2*** *
3		120±0***	91±1	29±0***	106±0	556±3*
4		116±0****	88±0	28±0****	103±0****	574±0****
5		117±0****	89±0	28±0****	104±0***	565±2**
6		117±0****	88±0	28±1****	104±0***	565±1**
7		116±0****	89±1	28±0****	104±0***	555±1
8		118±0****	88±0	29±1***	104±0***	543±2

*Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг агонистического mAb против NPR1 R5381 или PBS, как показано в таблице 28. Все значения представляют собой среднее ±SEM, n=4-5 на группу. Статистический анализ - односторонний ANOVA с критерием Даннета; *p<0,05 vs. PBS; **p<0,01 vs. PBS; ***p<0,001 vs. PBS; ****p<0,0001 vs. PBS.*

[0244] Животных по отдельности держали в стандартных условиях (температуры от 64°F до 84°F (от 18°C до 29°C); относительная влажность от 30% до 70%) и поддерживали цикл 12 часов освещения/12 часов темноты. Пищу (стандартный гранулированный корм исследовательской категории) и воду предоставляли свободно.

[0245] Тестируемые белки вводили соответствующим животным посредством однократной подкожной инъекции в день 0. Резервные средств вводили соответствующим животным посредством однократной подкожной или внутривенной инъекции в день 3. Объем дозы для каждого животного основан на последнем по времени измерении массы тела. Сбор ночной мочи осуществляли в дни исследования 20 и 21.

[0246] Систолическое давление, диастолическое давление, пульсовое давление, среднее артериальное давление и частоту сердечных сокращений собирали в течение 10 секунд каждые 10 минут в течение периода тестирования. Данные группировали и оценивали таким образом для острого (почасовое группирование) и хронического (24-часовое группирование) реверсирования R5381-индуцированного снижения артериального давления. Концентрации циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в

день 21/22 в моче анализировали посредством ELISA. Все данные приведены как среднее \pm SEM.

Результаты

[0247] Скрининг in vivo моновалентных антител против R5381 показал быстрое и постоянное реверсирование эффектов снижения артериального давления R5381 (таблица 30 ниже; фигура 8 и фигура 9).

Таблица 30: День 4-20 - среднее артериальное давление и частоты сердечных сокращений после введения резервного средства

Группа	Тестируемый препарат:	Резервный препарат	Путь введения резервного препарата	Систолическое давление (мм рт.ст.)	Диастолическое давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериальное давление (мм рт.ст.)	Частота сердечных сокращений (уд./мин)
1	PBS	PBS	i.v.	125 \pm 0****	90 \pm 0* *	34 \pm 0** **	109 \pm 0*** *	534 \pm 2* ***
2	R5381	mAb	s.c.	119 \pm 0	88 \pm 0	31 \pm 0	105 \pm 0	550 \pm 3
3		REGN 6580		130 \pm 0****	94 \pm 0* ***	36 \pm 0** **	113 \pm 0*** *	522 \pm 2* ***
4		REGN 9035		125 \pm 0****	91 \pm 0* ***	34 \pm 0** **	109 \pm 0*** *	550 \pm 2
5		REGN 9037		126 \pm 0****	92 \pm 0* ***	35 \pm 0** **	110 \pm 0*** *	531 \pm 2* ***
6		REGN 6580	i.v.	129 \pm 1****	94 \pm 1* ***	34 \pm 0** **	113 \pm 1*** *	524 \pm 2* ***
7		REGN 9035		126 \pm 0****	92 \pm 0* ***	34 \pm 0** **	110 \pm 0*** *	528 \pm 2* ***
8		REGN		129 \pm 1****	92 \pm 1* ***	37 \pm 0** **	111 \pm 1*** *	514 \pm 2* ***

		9037			***	**	*	***
--	--	------	--	--	-----	----	---	-----

Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей $NPR1^{hu/hu}$ рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг агонистического mAb против R5381 или PBS, как показано в таблице 28. Все значения представляют собой среднее \pm SEM, $n=4-5$ на группу. Статистический анализ - односторонний ANOVA с критерием Даннета; * $p<0,05$ vs. изотипический контроль; ** $p<0,01$ vs. изотипический контроль; *** $p<0,001$ vs. изотипический контроль; **** $p<0,0001$ vs. изотипический контроль.

[0248] REGN9035 и REGN9037 при внутривенном или подкожном введении через 3 дня после исходного введения R5381 могли повышать давление обратно к исходным уровням (таблица 30; фигура 8 и фигура 9). Исходное падение абсолютного давления на 3-6 мм рт.ст. (таблица 29) и относительного давления на ~ 10 мм рт.ст. (фигура 8) по сравнению с совпадающими по времени контролями реверсировали в пределах часов после внутривенного введения REGN9035, REGN9037 или REGN6580 (фигура 9). При подкожном введении REGN9035, REGN9037 или REGN6580 достигали полного реверсирования в пределах 24 часов после введения средства обратного действия (фигура 9). Устойчивость реверсирования поддерживали в течение 20-дневного исследования со статистически значимыми различиями по всем гемодинамическим параметрам у животных, которым вводили REGN9035 или REGN9037, по сравнению с животными, которым вводили R5381 и mAb изотипического контроля (таблица 30, фигура 8). При сравнении с контрольными животными, которым вводили PBS, не наблюдали статистически значимые различия (таблица 30, фигура 8) после введения REGN9035, REGN9037 или REGN6580, что свидетельствовало о полном и устойчивом реверсировании эффектов R5381-индуцированного снижения артериального давления. Сниженное давление, индуцированное R5381, приводило к меньшей массе сердца (таблица 31 ниже), вероятно, результату сниженной постнагрузке левого желудочка, индуцированной агонизмом NPR1.

Таблица 31: Абсолютная и относительная масса сердца

Группа	Тестированный препарат:	Резервный препарат	Путь введения резервного средства	Масса сердца (мг)	Масса головного мозга (мг)	Длина берцовой кости (мм)	Масса сердца: масса головног	Масса сердца: длина большеберцовой кости
1	PBS	PBS	i.v.	126 \pm 0	482 \pm 0	17,4 \pm 0	0,26 \pm 0	7,2 \pm 0
2	R5381	mAb изотипич	s.c.	112 \pm 0	481 \pm 0	17,8 \pm 0	0,23 \pm 0	6,3 \pm 0

		еского контроля						
3		REGN658 0		128±0	476±0	17,6±0	0,27±0*	7,3±0*
4		REGN903 5		126±0	463±0	17,6±0	0,27±0*	7,1±0
5		REGN903 7		133±0*	468±0	17,8±0	0,28±0**	7,5±0**
6		REGN658 0	i.v.	120±0	472±1	17,7±0	0,25±1	6,8±0
7		REGN903 5		125±0	476±0	17,8±0	0,26±0	7,0±0
8		REGN903 7		125±0	463±1	17,4±0	0,27±1*	7,2±0

*Телеметрически измеряемых нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} рандомизировали в группы с учетом систолического артериального давления и массы тела. Животных подвергали одной подкожной инъекции 5 мг/кг агонистического mAb против R5381 или PBS, как показано в таблице 28. Все значения представляют собой среднее ±SEM, n=4-5 на группу. Статистический анализ - односторонний ANOVA с критерием Даннета; *p<0,05 vs. изотипический контроль; **p<0,01 vs. изотипический контроль.*

[0249] Структурные изменения миокарда улучшались (таблица 31) после введения любого из средств обратного действия, REGN9035, REGN9037 или REGN6580. И наконец, все mAb против R5381 демонстрировали уменьшение передачи сигнала NPR1, о чем свидетельствует статистически значимое снижение цГМФ с подкожным или внутривенным введением через 22 дня (фигура 10).

[0250] Бивалентные и моновалентные антитела против R5381 REGN6580, и REGN9035 и REGN9037, соответственно, быстро и устойчиво реверсировали эффекты снижения артериального давления R5381 и ингибировали NPR1-индуцированную продукцию цГМФ до дня исследования 21 после однократной подкожной или внутривенной инъекции в день исследования 3 нормотензивных мышам NPR1^{hu/hu}, которым вводили однократную дозу R5381.

Пример 14. Резервная терапия мидодрином после однократной внутривенной дозы R5381 у телеметрически измеряемых яванских макаков

[0251] Исследование in vivo осуществляли для оценки агониста альфа-адренергического рецептора мидодрина в качестве эффективного средства для транзиторного реверсирования эффектов снижения артериального давления R5381 у яванских макаков. Животным вводили однократный IV болюс 25 мг/кг R5381 и через 3 дня вводили 3 дозы 2,5 мг/кг мидодрина с помощью желудочного зонда с интервалом от 3

до 4 часов между дозами. Животных подвергали мониторингу в течение 4 дней после введения R5381, включая 1 день после введения мидодрин, для оценки гемодинамических изменений; измерения перед введением служили в качестве исходного уровня для каждого животного. Мидодрин транзиторно реверсировал R5381-индуцированные снижения среднего систолического артериального давления до уровней совпадающих по времени контролей. Мидодрин также транзиторно реверсировал R5381-индуцированные повышения средней частоты сердечных сокращений и приводил к среднему снижению относительно исходной частоты сердечных сокращений у животных, которым вводили R5381.

[0252] В частности, повышение пригодности введения вазопрессора в качестве средства для транзиторного реверсирования эффектов R5381 в отношении артериального давления у нормотензивных телеметрически измеряемых самцов яванского макака особенно важен для клинических условий, в которых пациенту с R5381 может потребоваться повышение артериального давления (например, в случае шоковой гипотензии). Перед введением дозы каждому животному хирургически имплантировали радиотелеметрический передатчик. В день 0 каждому животному вводили однократный болюс IV физиологического раствора (PBS; n=10) или 25 мг/кг R5381 (n=13). В день 3 каждому животному вводили три дозы 2,5 мг/кг агониста альфа-адренергического рецептора мидодрина (n=6 в группе физиологического раствора; n=7 в группе R5381) или воду/носитель (n=4 в группе физиологического раствора; n=6 в группе R5381) с помощью желудочного зонда с интервалом от 3 до 4 часов между дозами. Животных подвергали мониторингу в течение 48 часов для оценки сердечно-сосудистых, гемодинамических изменений. Измерения артериального давления и частоты сердечных сокращений собирали для каждого животного со дня -3 перед введением R5381 до дня 4 после введения R5381. Измерения перед введением служили в качестве исходного уровня для каждого животного.

Результаты

[0253] Мидодрин реверсировал эффекты R5381 в отношении артериального давления и частоты сердечных сокращений у яванских макаков. Три дозы мидодрина транзиторно реверсировали R5381-индуцированное снижение среднего систолического артериального давления, при этом животные, которым вводили R5381 и которым вводили мидодрин, демонстрировали схожие средние изменения относительно исходного систолического артериального давления по сравнению с наблюдаемым у животных, которым вводили физиологический раствор, но которым не вводили мидодрин (фигура 11).

[0254] Кроме того, 3 дозы мидодрина реверсировали R5381-индуцированное повышение средней частоты сердечных сокращений. Введение мидодрина приводило к среднему снижению относительно исходной частоты сердечных сокращений в животных, которым вводили R5381; схожий эффект наблюдали у животных, которым вводили физиологический раствор и которым вводили мидодрин (фигура 12).

[0255] Настоящее изобретение не ограничено по своему объему конкретными вариантами осуществления, представленными в настоящем описании. Фактически, различные модификации, в дополнение к представленным в настоящем описании, будут очевидны специалистам в этой области из изложенного выше описания и сопутствующих фигур. Такие модификации предназначены для включения в объем формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство, реверсирующее гемодинамические эффекты агониста рецептора 1 натрийуретического пептида (NPR1).
2. Средство, реверсирующее снижение артериального давления, ассоциированное с введением агониста рецептора 1 натрийуретического пептида (NPR1).
3. Средство по п.1 или 2, где средство выбрано из группы, состоящей из иммуноглобулинового белка, вазопрессора, агониста альфа-адренорецептора, стероида, антидиуретического гормона, ингибитора ангиогенеза и низкомолекулярного средства, повышающего артериальное давление.
4. Средство по любому из пп.1-3, где средство является иммуноглобулиновым белком.
5. Средство по любому из пп.1-4, где средство специфически связывается с агонистом NPR1.
6. Средство по любому из пп.1-5, где агонист NPR1 является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с NPR1.
7. Средство по п.6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей SEQ ID NO: 48; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей SEQ ID NO: 52.
8. Средство по п.6 или 7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащие SEQ ID NO: 49, 50 и 51, соответственно; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащие SEQ ID NO: 53, 54 и 55, соответственно.
9. Средство по п.8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR SEQ ID NO: 48 и LCVR SEQ ID NO: 52.
10. Средство по любому из пп.6-9, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является моноклональным антителом.
11. Средство по п.10, где антитело является антителом IgG1.
12. Средство по п.10, где антитело является антителом IgG4.
13. Средство по п.10, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 56, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 57.
14. Средство по любому из пп.1-13, где агонист NPR1 является R5381.
15. Средство по любому из пп.4-14, где иммуноглобулиновый белок включает моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, Fab-фрагмент, F(ab)₂-фрагмент, Fv-фрагмент, Fd-фрагмент, scFv, dAb, бивалентное моноклональное антитело или моновалентное моноклональное антитело.
16. Средство по п.15, где иммуноглобулиновый белок содержит по меньшей мере один иммуноглобулиновый варибельный домен, содержащий 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).

17. Средство по п.15 или 16, где иммуноглобулиновый белок содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и 16; или SEQ ID NO: 24, 26, 28, 32, 34 и 36.

18. Средство по п.17, где HCVR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, необязательно, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности в отношении последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22.

19. Средство по п.17 или 18, где LCVR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, необязательно, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности в отношении последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

20. Средство по любому из пп.17-19, где HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22; и LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

21. Средство по любому из пп.17-20, где HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

22. Средство по любому из пп.17-20, где HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

23. Средство по любому из пп.17-22, где иммуноглобулиновый белок содержит моноклональное антитело человека, содержащее по меньшей мере один иммуноглобулиновый вариабельный домен.

24. Средство по п.23, где человек моноклональное антитело имеет изотип IgG1 или IgG4.

25. Средство по п.23 или 24, где моноклональное антитело человека содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и 38.

26. Средство по любому из пп.23-25, где моноклональное антитело человека содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 40.

27. Средство по любому из пп.4-15, где иммуноглобулиновый белок содержит один иммуноглобулиновый вариабельный домен.

28. Средство по п.27, где один иммуноглобулиновый вариабельный домен

содержит три определяющие комплементарности области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (HCVR), и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR), где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 24; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 26; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 28; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 32; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 34; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 36.

29. Средство по п.28, где HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из (i) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и 16; и (ii) SEQ ID NO: 24, 26, 28, 32, 34, и 36.

30. Средство по п.28 или 29, где HCVR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, необязательно, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности в отношении последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22.

31. Средство по любому из пп.28-30, где LCVR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, необязательно, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности в отношении последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

32. Средство по любому из пп.28-31, где HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22; и LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

33. Средство по любому из пп.28-32, где HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

34. Средство по любому из пп.28-32, где HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

35. Средство по любому из пп.26-34, где один иммуноглобулиновый варибельный домен содержится в Fab-фрагменте.

36. Средство по любому из пп.26-35, дополнительно содержащее мультимеризационный компонент.

37. Средство по п.36, где мультимеризационный компонент содержит по меньшей мере один Fc-фрагмент.

38. Средство по п.37, где Fc-фрагмент имеет изотип IgG1, IgG4 или его вариант.

39. Средство по п.38, где Fc-фрагмент имеет изотип IgG4.
40. Средство по п.38, где Fc-фрагмент имеет изотип IgG1.
41. Средство по любому из пп.37-40, содержащее первый Fc-фрагмент и второй Fc-фрагмент, где первый Fc-фрагмент или второй Fc-фрагмент, но не оба Fc-фрагмента, содержит модификацию в домене СН3, снижающую связывание иммуноглобулинового белка с протеином А по сравнению с иммуноглобулиновым белком, в котором отсутствует модификация.
42. Средство по п.41, где модификация содержит замену Н315R и замену Y316F (нумерация EU) в Fc-фрагменте.
43. Средство по любому из пп.37-42, где мультимеризационный компонент содержит Fc-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и Fc-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.
44. Средство по любому из пп.16-22 или 26-34, где иммуноглобулин переменный домен содержится в моновалентном моноклональном антителе.
45. Средство по п.44, где моновалентное моноклональное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую константную область тяжелой цепи и HCVR, и легкую цепь, содержащую LCVR.
46. Средство по п.45, где константная область тяжелой цепи содержит модификацию в домене СН3, снижающую связывание иммуноглобулинового белка с протеином А по сравнению с иммуноглобулиновым белком, в котором отсутствует модификация.
47. Средство по п.46, где модификация содержит замену Н315R и замену Y316F (нумерация EU) в константной области тяжелой цепи изотипа IgG1 или IgG4.
48. Средство по любому из пп.45-47, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.
49. Средство по любому из пп.45-47, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.
50. Средство по любому из пп.44-49, где иммуноглобулиновый белок дополнительно содержит Fc-фрагмент.
51. Средство по п.50, где Fc-фрагмент принадлежит изотипу IgG1 или IgG4.
52. Средство по п.50 или 51, где Fc-фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.
53. Средство по любому из пп.1-52, где средство является REGN9035 или REGN9037.
54. Выделенная молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи (HCVR) иммуноглобулинового белка по любому из пп.15-53.
55. Выделенная молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотидную

последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи (LCVR) иммуноглобулинового белка по любому из пп.15-53.

56. Вектор, содержащий молекулу полинуклеотида по п.54 и/или молекулу полинуклеотида по п.55.

57. Клетка-хозяин, экспрессирующая вектор по п.56.

58. Клетка-хозяин по п.57, где клетка-хозяин является клеткой CHO.

59. Способ получения иммуноглобулинового белка, включающий выращивание клетки-хозяина по п.57 в условиях, делающих возможной продукцию белка, и выделение получаемого таким образом белка.

60. Способ по п.59, где клетка-хозяин является клеткой CHO.

61. Средство по любому из пп.1-3, где средство является вазопрессором.

62. Средство по п.61, где вазопрессор является мидодринном.

63. Фармацевтическая композиция, содержащая средство по любому из пп.1-53 и фармацевтически приемлемый носитель или дилуент.

64. Способ реверсирования гемодинамических эффектов агониста NPR1, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество средства по любому из пп.1-53, нуждающемуся в этом индивидууму.

65. Способ реверсирования гемодинамических изменений, ассоциированных с введением агониста NPR1, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество средства по любому из пп.1-53, нуждающемуся в этом индивидууму.

66. Способ по п.64 или 65, где композицию вводят индивидууму подкожно, внутривенно, внутрикочно, интраперитонеально, внутримышечно или перорально.

67. Способ по любому из пп.64-66, где агонист NPR1 является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с NPR1.

68. Способ по п.67, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в переменной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей SEQ ID NO: 48; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в переменной области легкой цепи (LCVR), содержащей SEQ ID NO: 52.

69. Способ по любому из пп.64-68, где агонист NPR1 является R5381.

70. Способ по любому из пп.64-69, где индивидуум имеет заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из гипертензии, сердечной недостаточности и хронического заболевания почек.

71. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующее за связывание со средством по любому из пп.15-53.

72. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающееся с тем же эпитопом, что и средство по любому из пп.15-53.

73. Иммуноглобулиновый белок, содержащий:

(а) один иммуноглобулиновый вариабельный домен, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), где HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), где LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

74. Иммуноглобулиновый белок, содержащий:

(а) один иммуноглобулиновый вариабельный домен, содержащий три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), где HCDR1-HCDR2-HCDR3 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 6 и 8, и 24, 26 и 28, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), где LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 14 и 16, и 32, 34 и 36.

75. Иммуноглобулиновый белок по п.74, где:

(i) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; или

(ii) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

76. Иммуноглобулиновый белок по п.74 или 75, где HCVR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, необязательно, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности в отношении последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22.

77. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.74-76, где LCVR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, необязательно, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности в отношении последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

78. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.74-77, где HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22; и где LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

79. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.73-78, где:

(1) HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и LCVR

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или

(2) HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

80. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.73-79, дополнительно содержащий мультимеризационный компонент.

81. Иммуноглобулиновый белок по п.80, где мультимеризационный компонент содержит по меньшей мере один Fc-фрагмент.

82. Иммуноглобулиновый белок по п.81, где Fc-фрагмент принадлежит изотипу IgG1 или IgG4 человека.

83. Иммуноглобулиновый белок по п.81 или 82, содержащий первый Fc-фрагмент и второй Fc-фрагмент, где первый Fc-фрагмент или второй Fc-фрагмент, но не оба Fc-фрагмента, содержит модификацию в домене СН3, снижающую связывание иммуноглобулинового белка с протеином А по сравнению с иммуноглобулиновым белком, в котором отсутствует модификация.

84. Иммуноглобулиновый белок по п.83, где модификация содержит замену Н315R и замену Y316F (нумерация EU) в Fc-фрагменте.

85. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.80-84, содержащий первый Fc-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и второй Fc-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

86. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.73-85, содержащий HCVR SEQ ID NO: 2, LCVR SEQ ID NO: 10 и мультимеризационный компонент, где мультимеризационный компонент содержит первый Fc-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и второй Fc-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

87. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.73-85, содержащий HCVR SEQ ID NO: 22, LCVR SEQ ID NO: 30 и мультимеризационный компонент, где мультимеризационный компонент содержит первый Fc-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и второй Fc-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

88. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.73-79, где иммуноглобулиновый белок содержит тяжелую цепь, содержащую HCVR и константную область тяжелой цепи, и легкую цепь, содержащую LCVR и константную область легкой цепи, где тяжелая цепь принадлежит изотипу IgG1 или IgG4 человека.

89. Иммуноглобулиновый белок по п.88, где константная область тяжелой цепи содержит модификацию в домене СН3, снижающую связывание иммуноглобулинового белка с протеином А по сравнению с иммуноглобулиновым белком, в котором отсутствует модификация.

90. Иммуноглобулиновый белок по п.89, где модификация содержит замену Н315R и замену Y316F (нумерация EU) в константной области тяжелой цепи изотипа IgG1 или IgG4.

91. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.88-90, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42 и 44.

92. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.88-91, где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 40.

93. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.88-92, где:

(i) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; или

(ii) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

94. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.88-93, дополнительно содержащий мультимеризационный компонент.

95. Иммуноглобулиновый белок по п.94, где мультимеризационный компонент содержит Fc-фрагмент.

96. Иммуноглобулиновый белок по п.96, где Fc-фрагмент принадлежит изотипу IgG1 или IgG4 человека.

97. Иммуноглобулиновый белок по п.95 или 96, где Fc-фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

98. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.88-97, содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и Fc-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

99. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.88-97 содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и Fc-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

100. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.73-99, где иммуноглобулиновый белок специфически связывается с агонистом NPR1.

101. Иммуноглобулиновый белок по п.100, где агонист NPR1 является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с NPR1.

102. Иммуноглобулиновый белок по п.101, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

103. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.100-102, где агонист NPR1 является R5381.

104. Иммуноглобулиновый белок по любому из пп.73-103, где иммуноглобулиновый белок является REGN9035 или REGN9037.

105. Выделенная молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотидную

последовательность, кодирующую HCVR иммуноглобулинового белка по любому из пп.73-104.

106. Выделенная молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую LCVR иммуноглобулинового белка по любому из пп.73-104.

107. Вектор, содержащий молекулу полинуклеотида по п.105 и/или молекулу полинуклеотида по п.106.

108. Клетка-хозяин, экспрессирующая вектор по п.107.

109. Клетка-хозяин по п.108, где клетка-хозяин является клеткой CHO.

110. Способ получения иммуноглобулинового белка, включающий выращивание клетки-хозяина по п.108 в условиях, делающих возможной продукцию белка, и выделение полученного таким образом белка.

111. Способ по п.110, где клетка-хозяин является клеткой CHO.

112. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноглобулиновый белок по любому из пп.73-104 и фармацевтически приемлемый носитель или дилуэнт.

113. Способ реверсирования гемодинамических эффектов агониста NPR1, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество иммуноглобулинового белка по любому из пп.73-104, нуждающемуся в этом индивидууму.

114. Способ реверсирования гемодинамических изменений, ассоциированных с введением агониста NPR1, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество иммуноглобулинового белка по любому из пп.73-104, нуждающемуся в этом индивидууму.

115. Способ по п.113 или 114, где композицию вводят индивидууму подкожно, внутривенно, внутривожно, интраперитонеально, внутримышечно или перорально.

116. Способ по любому из пп.113-115, где агонист NPR1 является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с NPR1.

117. Способ по п.116, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

118. Способ по любому из пп.113-117, где агонист NPR1 является R5381.

119. Способ по любому из пп.113-118, где индивидуум имеет заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из гипертензии, сердечной недостаточности и хронического заболевания почек.

120. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующее за связывание с иммуноглобулиновым белком по любому из пп.73-104.

121. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающееся с тем же эпитопом, что и иммуноглобулиновый белок по любому из пп.73-104.

122. Композиция, содержащая: (i) иммуноглобулиновый белок по любому из пп.73-104; и (ii) агонист NPR1.

123. Композиция по п.122, где агонист NPR1 является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с NPR1.

124. Композиция по п.123, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

125. Композиция по любому из пп.122-124, где агонист NPR1 является R5381.

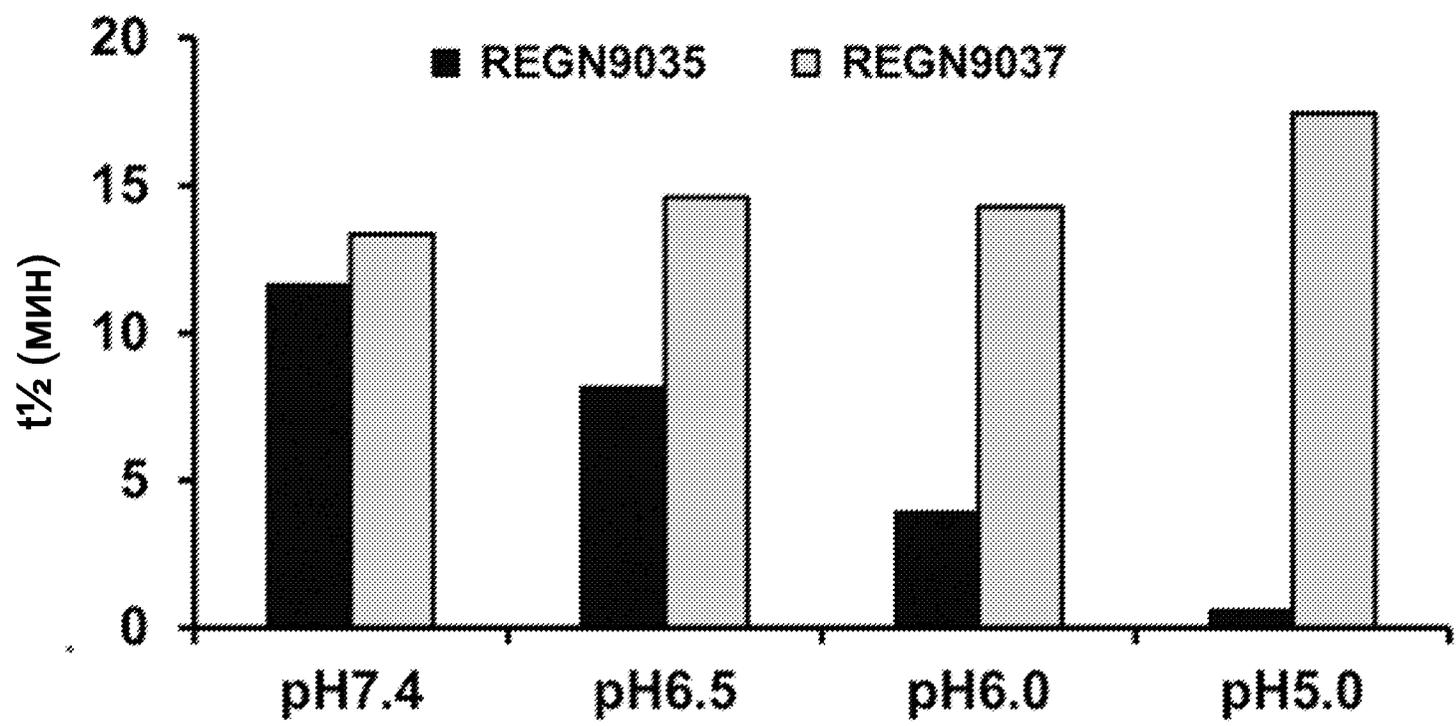
126. Композиция по любому из пп.122-125 для применения в способе эффективной регуляции артериального давления у нуждающегося в этом индивидуума.

127. Композиция по п.126, где индивидуум имеет NPR1-ассоциированное заболевание или нарушение.

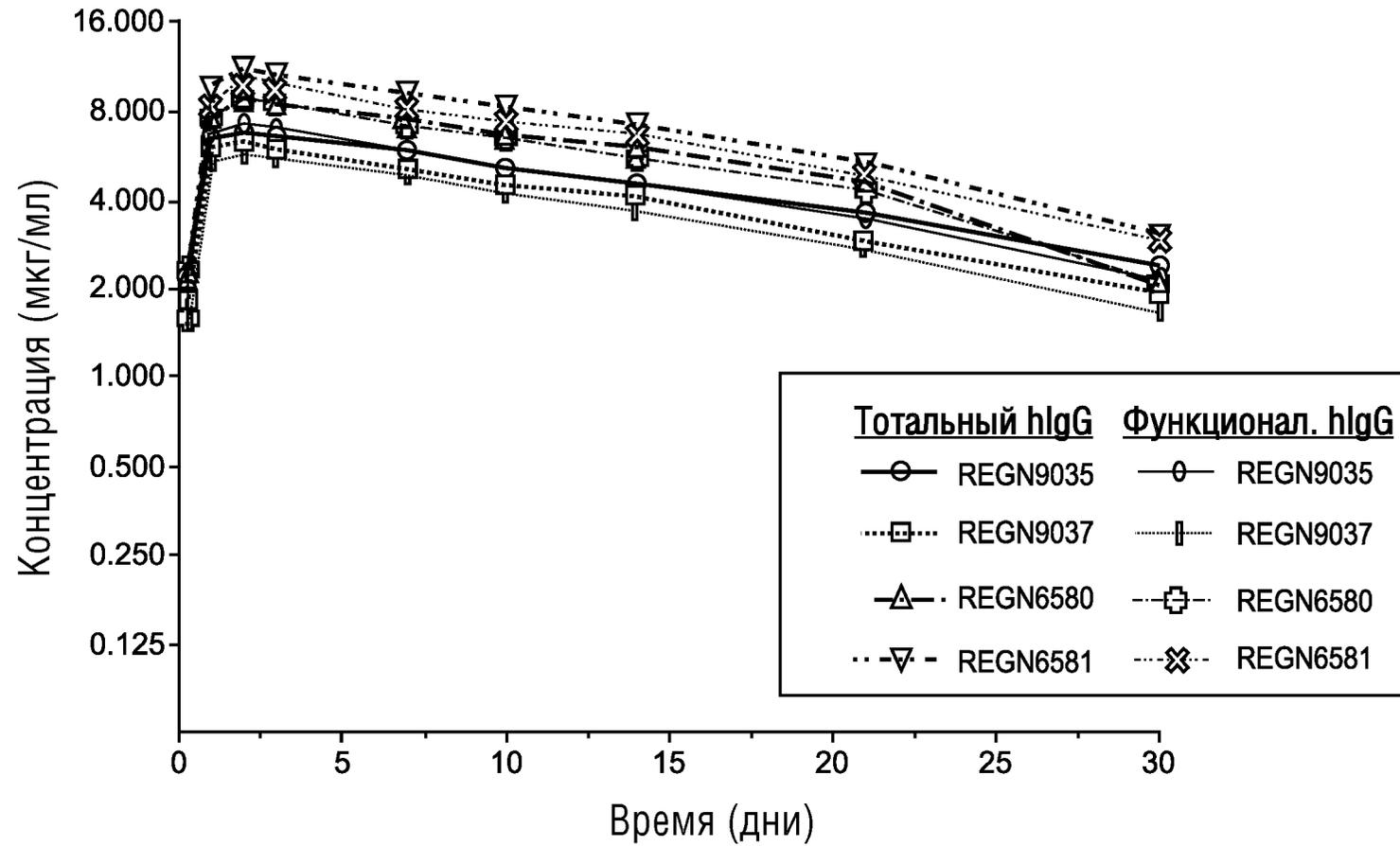
128. Композиция по п.127, где заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из гипертензии, сердечной недостаточности и хронического заболевания почек.

По доверенности

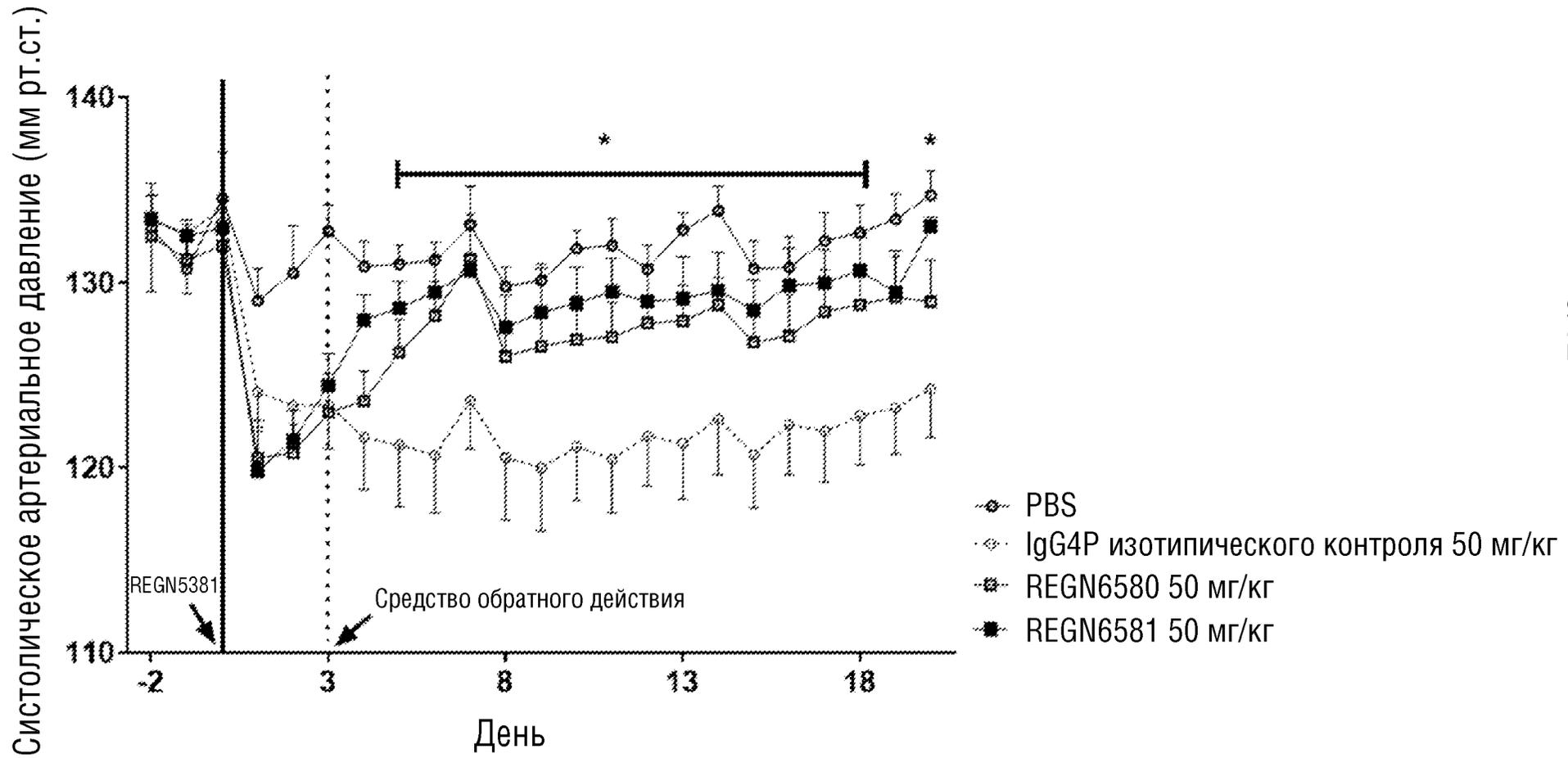
ФИГ.1



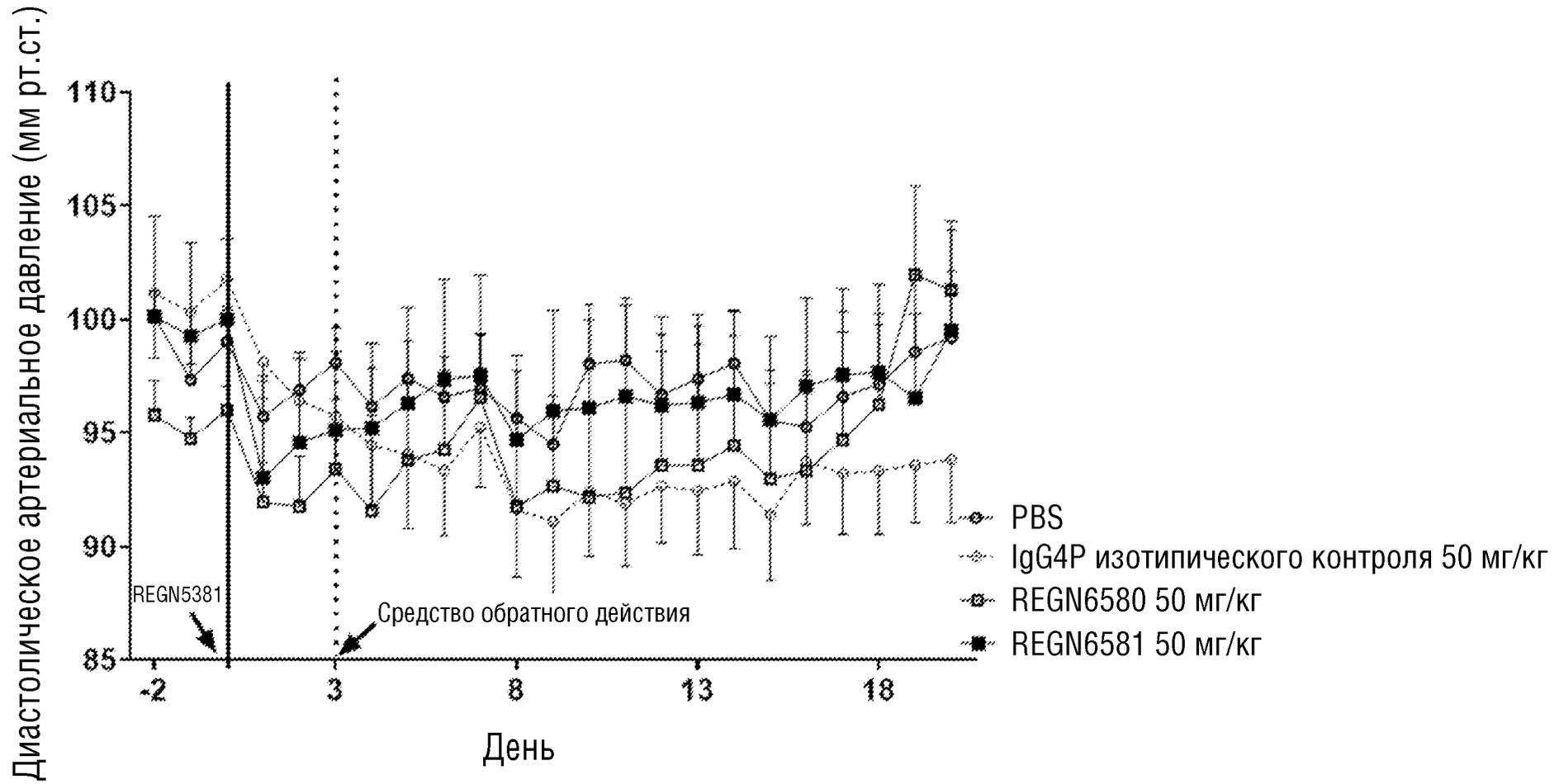
ФИГ.2



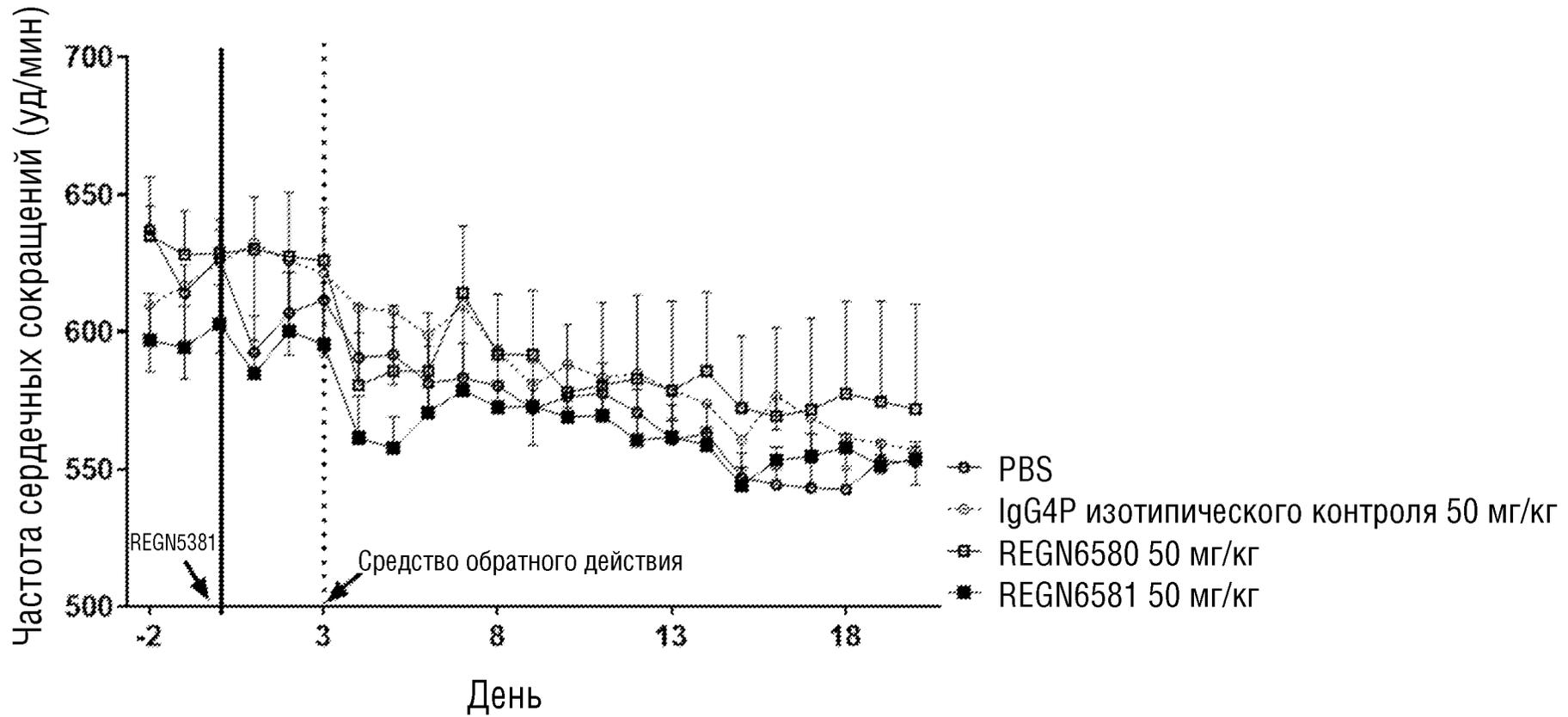
ФИГ.3



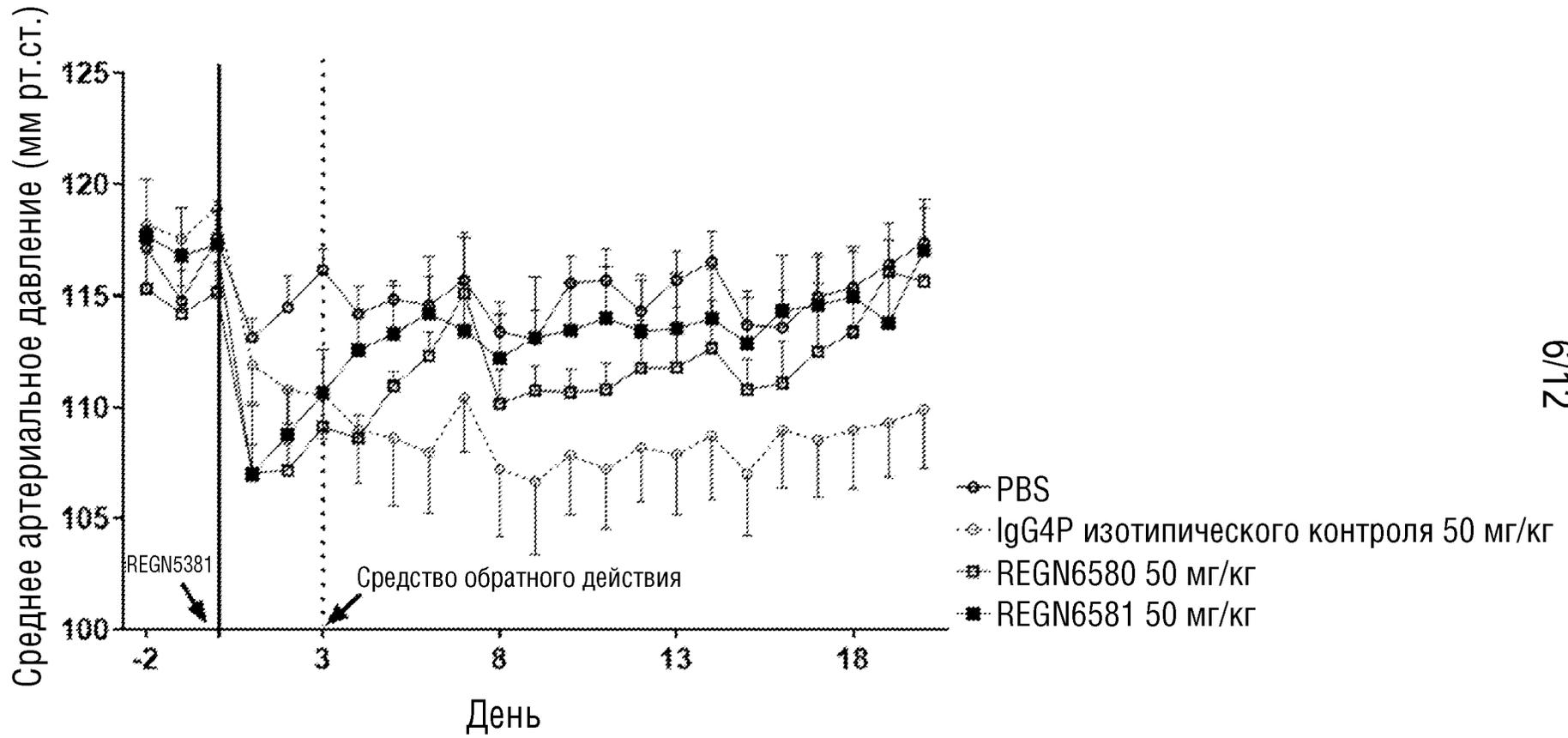
ФИГ.4



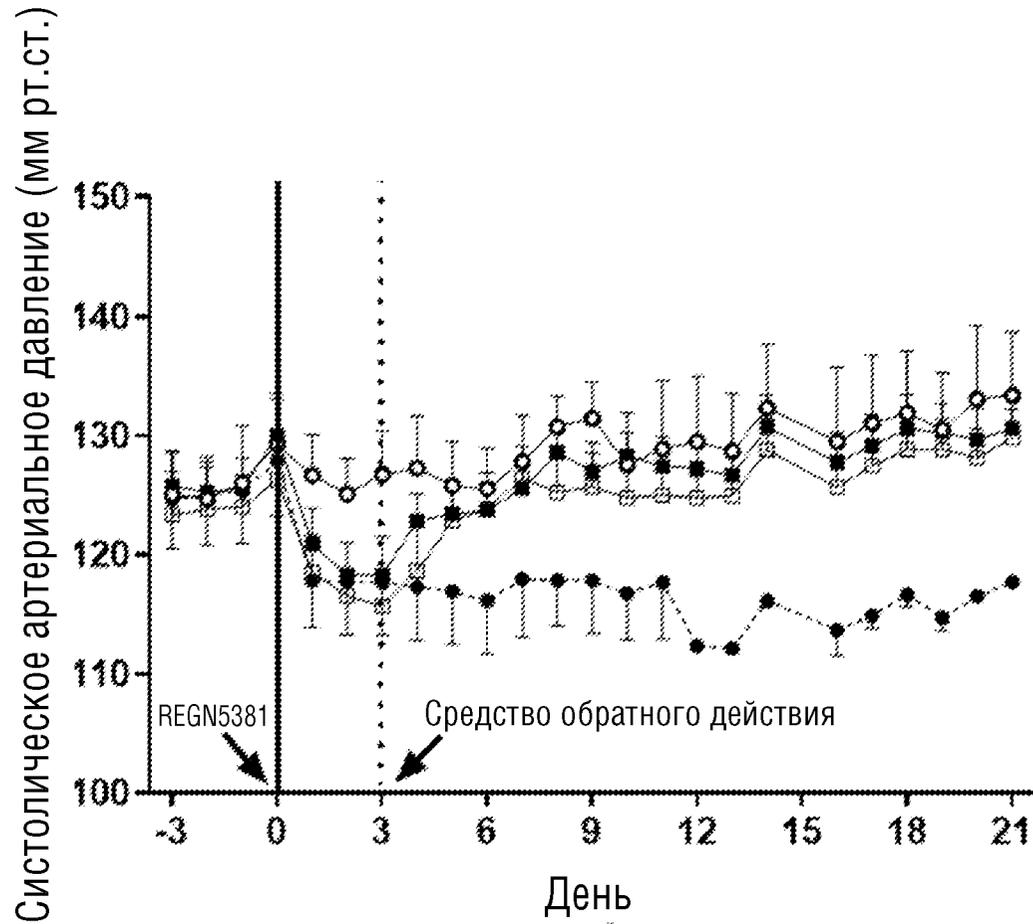
ФИГ.5



ФИГ.6

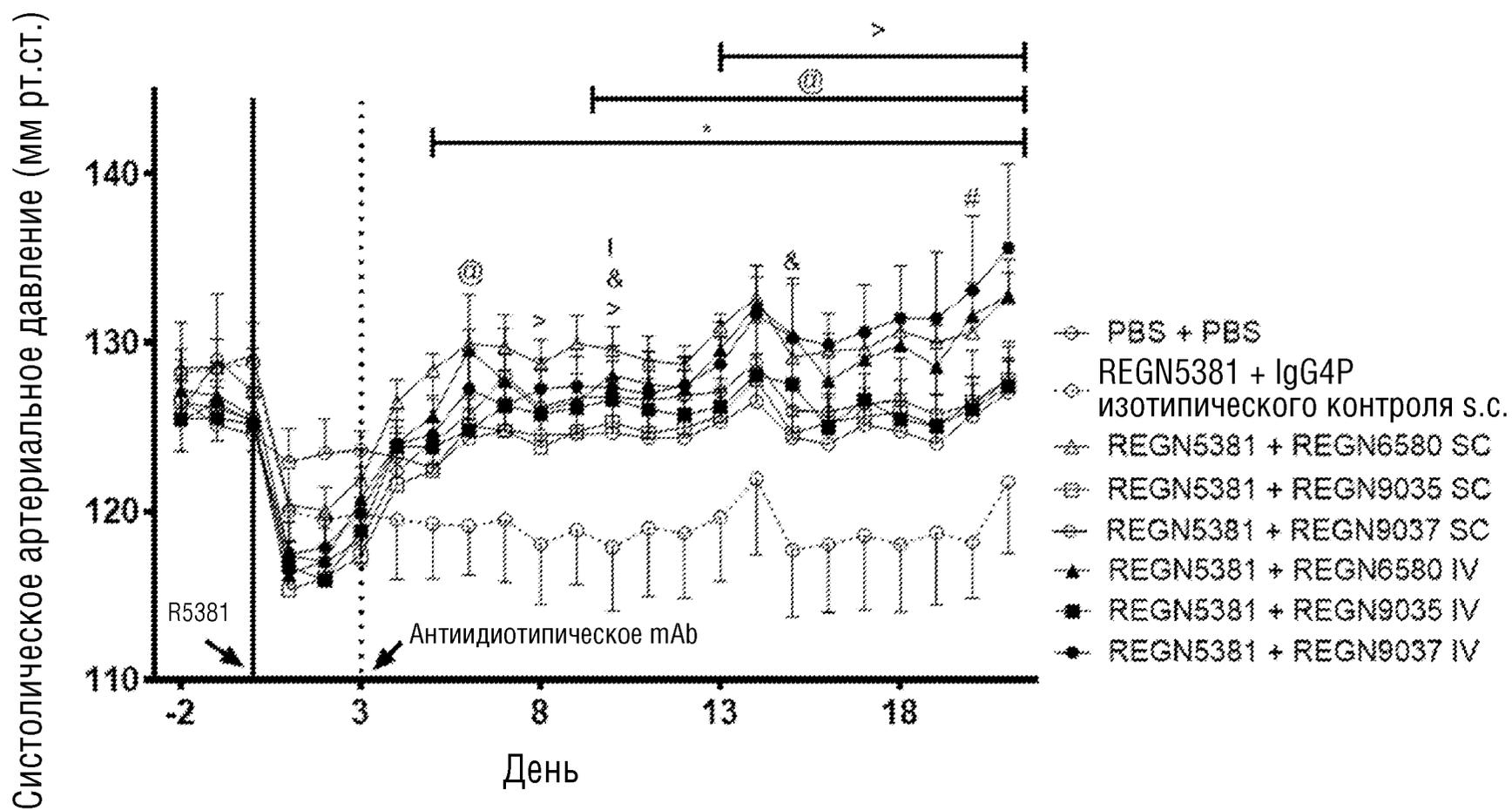


ФИГ.7

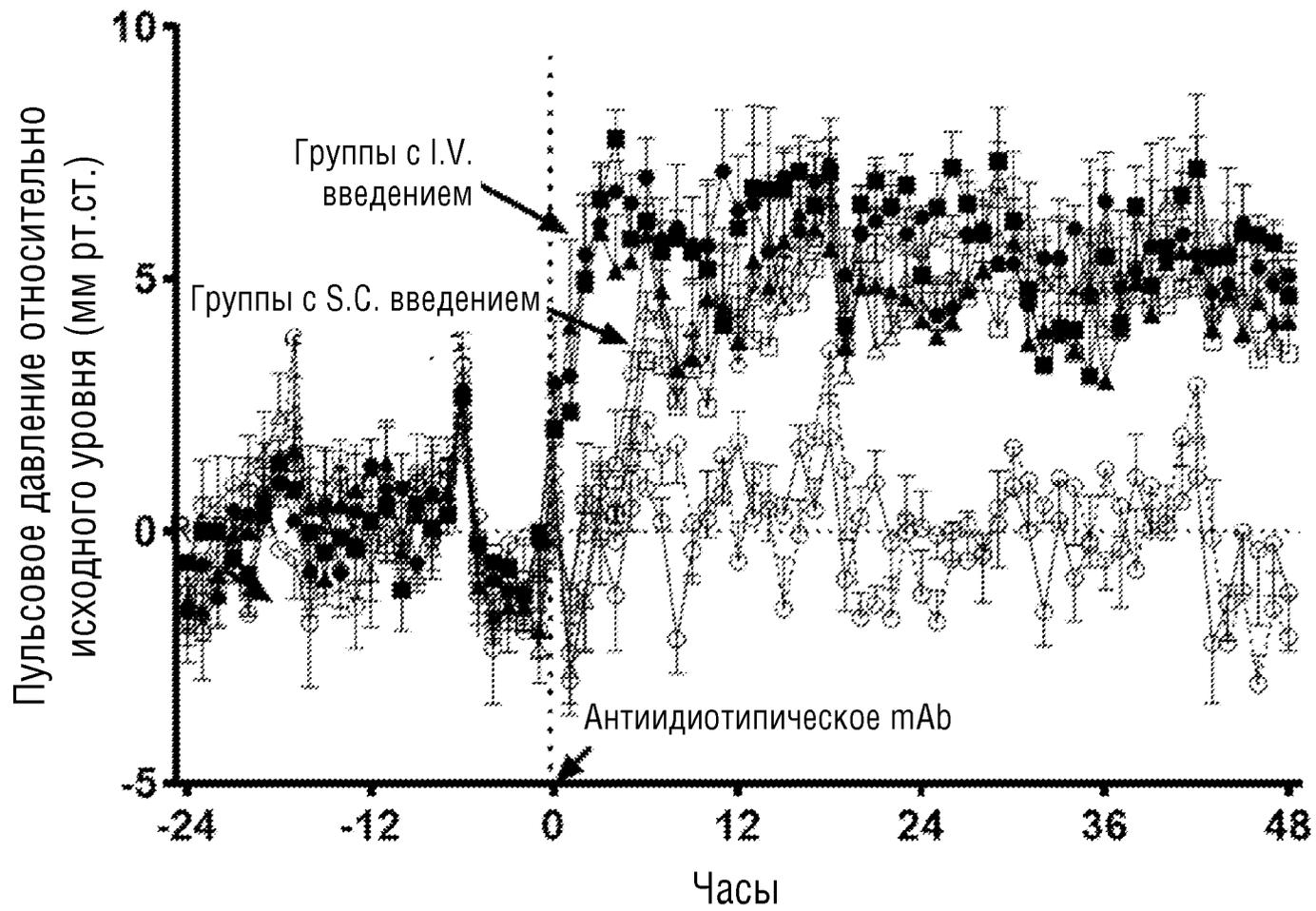


- PBS
- REGN5381 + IgG4P изотип. контроля
- REGN5381 + REGN6580
- REGN5381 + REGN6581

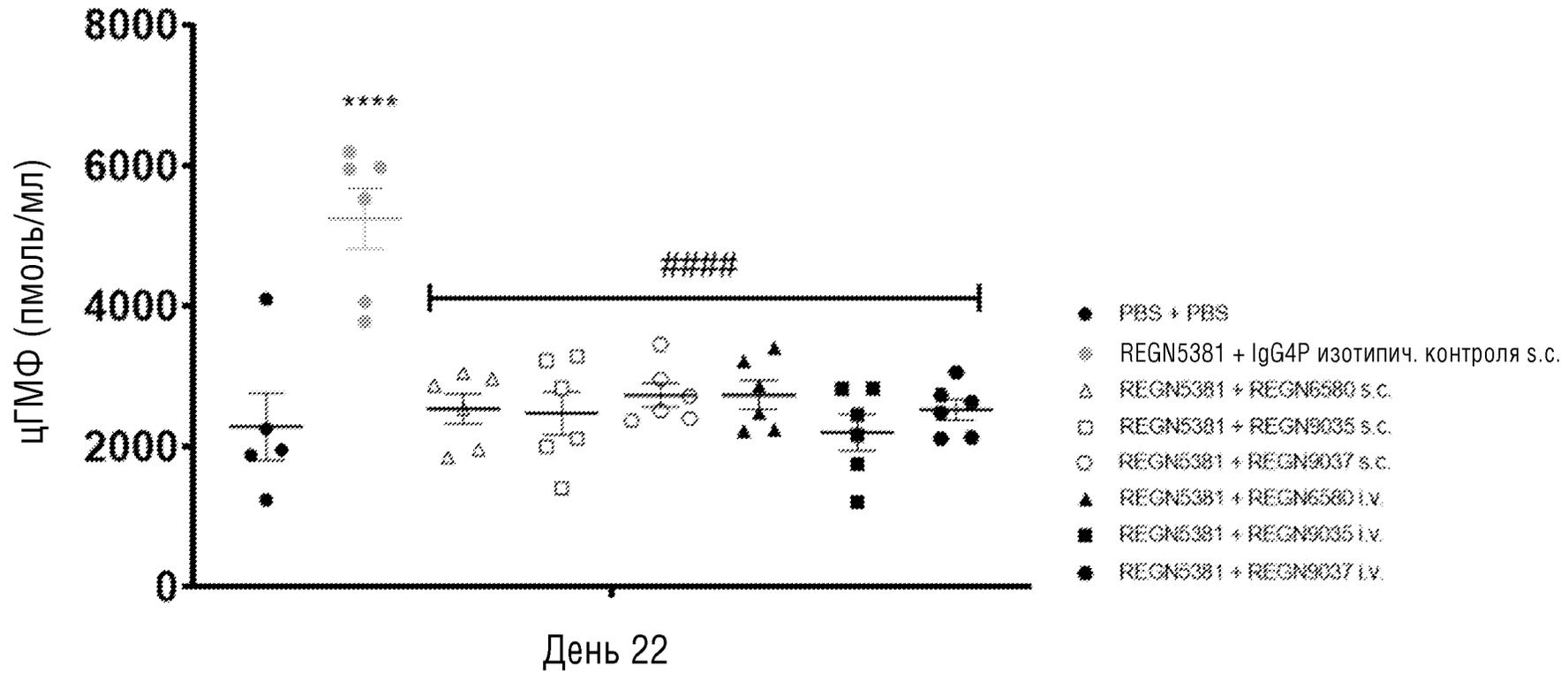
ФИГ.8



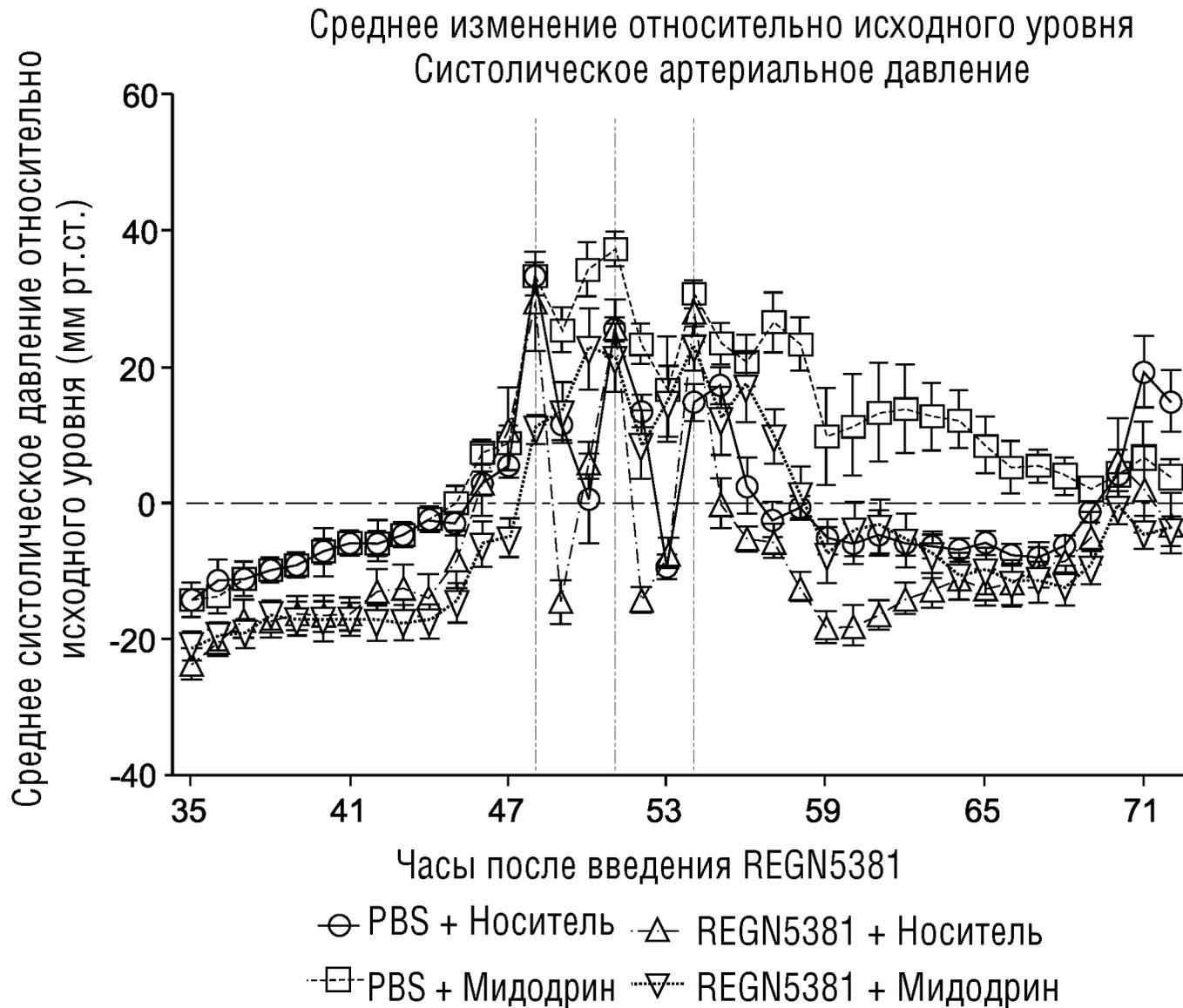
ФИГ.9



ФИГ.10



ФИГ.11



ФИГ.12

