

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046104**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.07

(21) Номер заявки
202191060

(22) Дата подачи заявки
2019.10.18

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

(54) **АНТИ-NPR1 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/749,557; 62/755,720**

(32) **2018.10.23; 2018.11.05**

(33) **US**

(43) **2021.07.12**

(86) **PCT/US2019/057033**

(87) **WO 2020/086406 2020.04.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Данн Майкл, Су Цзя, Местейтис
Джейсон, Громада Джеспер, Мортон
Лори (US)**

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

(56) US-A1-2016168251
LOWE D.G. ET AL.: "Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase. Hormone cross-linking and antibody reactivity distinguish receptor glycoforms", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 25 OCT. 1992, vol. 267, no. 30, 25 October 1992 (1992-10-25), pages 21691-21697, XP002797642, ISSN: 0021-9258, figure 5
US-A1-2012270923
US-A1-2014343120
WO-A1-2016131943

(57) Изобретение относится к моноклональным антителам, которые связываются с белком-рецептором натрийуретического пептида 1 (NPR1), и способам их применения. В различных вариантах осуществления изобретения антитела представляют собой полностью человеческие антитела, которые связываются с NPR1. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению полезны для активации активности NPR1, таким образом обеспечивая средства лечения или профилактики NPR1-ассоциированного заболевания, расстройства или состояния у людей.

B1

046104

046104

B1

Заявка на данное изобретение подана 18 октября 2019 г. как международная патентная заявка PCT, и по ней испрашивается приоритет по предварительным заявкам США № 62/749,557, поданной 23 октября 2018 г.; и 62/755,720, поданной 5 ноября 2018 г., раскрытие каждой из которых включено в настоящее описание во всей своей полноте посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые специфически связываются с рецептором натрийуретического пептида 1 (NPR1), и к терапевтическим и диагностическим методам применения этих антител.

Уровень техники

Рецептор натрийуретического пептида 1 (NPR1; также известный как NPR-A) принадлежит к семейству гуанилилциклазных рецепторов клеточной поверхности, ферментов, которые катализируют превращение GTP в циклический GMP. NPR1 имеет высокие уровни экспрессии в почках, легких, надпочечниках, сосудистой сети, головном мозге, печени, эндотелиальной и жировой тканях и более низкие уровни в сердце. Он активируется путем связывания с предсердным натрийуретическим пептидом (ANP) или мозговым натрийуретическим пептидом (BNP). Активация NPR1 и передача сигналов стимулируют многие физиологические реакции, в которые вовлечены многие ткани. Роль системы ANP-NPR1 в вазорелаксации, натрийурезе, диурезе, проницаемости эндотелия и несердечно-сосудистых функциях, таких как липолиз и функции иммунных клеток, хорошо изучена (Potter, 2011, Pharmacol. Ther. 130:71-82). Активация NPR1 приводит к натрийурезу (выведению соли почками) и понижает артериальное давление.

Моноклональные антитела к NPR1 были впервые описаны Kitano et al. в 1995 г. в Immunol. Lett. 47:215-22. Активирующие антитела или антитела-агонисты NPR1 раскрыты, например, в патентах/публикациях США № 9090695 и 20160168251 и в WO 2010/065293.

Полностью человеческие антитела, которые специфически связываются с белком NPR1 с высоким сродством и активируют его, могут оказаться важными для профилактики и лечения, например, гипертонии, ожирения и сердечной недостаточности.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с белком-рецептором натрийуретического пептида 1 (NPR1). В некоторых вариантах осуществления анти-NPR1 антитела представляют собой полностью человеческие антитела, которые связываются с NPR1 с высоким сродством и активируют NPR1 или стабилизируют активированную конформацию. Антитела по настоящему изобретению полезны, помимо прочего, для активации или усиления активности белка NPR1. В некоторых вариантах осуществления антитела полезны для профилактики, лечения или облегчения по меньшей мере одного симптома или признака NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства у субъекта. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить с целью профилактики или лечения субъекта, имеющего или подверженному риску развития NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства. В конкретных вариантах осуществления антитела используют для снижения системного артериального давления у субъекта, страдающего высоким артериальным давлением. Такие антитела можно использовать в качестве терапии расстройства, такого как сердечная недостаточность, путем введения нуждающемуся в этом субъекту.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитела связываются с NPR1 в присутствии или в отсутствие предсердного натрийуретического пептида (ANP) или мозгового натрийуретического пептида (BNP), т.е. антитела являются "пептид-независимыми связывающими веществами". Такие антитела имеют преимущество, поскольку их можно использовать для связывания и активации NPR1 независимо от различных концентраций эндогенного лиганда. Такие антитела при введении нуждающемуся в этом пациенту можно с успехом использовать, чтобы избежать изменчивости (в отношении концентрации лиганда) между пациентами при лечении. Кроме того, раскрытые в настоящем описании антитела связываются с NPR1 с высоким сродством и обладают улучшенными фармакокинетическими свойствами (по сравнению с лекарственными средствами стандартного лечения). Антитела показали $t_{1/2}$, достигающую 11 дней у мышей при дозе 25 мг/кг. Антитела являются эффективными в снижении артериального давления и поддержании пониженного давления в течение 28 дней при введении нуждающемуся в этом субъекту. Одна доза антитела по настоящему изобретению обеспечивала устойчивое снижение артериального давления. Такие антитела можно использовать для достижения более высокой эффективности наряду с менее частым дозированием субъекту, страдающему NPR1-ассоциированным заболеванием или расстройством (например, гипертонией).

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

В первом аспекте настоящего изобретения предлагаются выделенные рекомбинантные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с NPR1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается выделенное антитело

или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком-рецептором натрийуретического пептида 1 (NPR1), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с одной или более аминокислотами, содержащимися во внеклеточном домене NPR1 (аминокислотами 29-347 SEQ ID NO: 194), определенными с помощью замены водород/дейтерий, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (i) связывается с клетками, экспрессирующими человеческий NPR1 в присутствии или в отсутствие предсердного натрийуретического пептида (ANP); и/или (ii) связывается с NPR1 и активирует NPR1.

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

Примеры анти-NPR1 антител по настоящему изобретению приведены в табл. 1 и 2 в настоящем описании. В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR, HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител. В табл. 2 представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител.

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных анти-NPR1 антител, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбирают из одной из SEQ ID NO: 2/10 (например, mAb22033) и 66/74 (например, mAb22810).

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит указанную в табл. 1 аминокислотную последовательность, имеющую не более двенадцати аминокислотных замен, и/или указанная LCVR содержит указанную в табл. 1 аминокислотную последовательность, содержащую не более десяти аминокислотных замен. Например, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит указанную в табл. 1 аминокислотную последовательность, при этом указанная аминокислотная последовательность имеет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать аминокислотных замен. В другом примере настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная LCVR содержит указанную в табл. 1 аминокислотную последовательность, при этом указанная аминокислотная последовательность имеет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к анти-NPR1 антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в табл. 1, причем указанная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену, и/или указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в табл. 1, причем указанная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по

из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (например, mAb22033) и 68-70-72-76-78-80 (например, mAb22810).

В родственном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определенных для любого из иллюстративных антител, перечисленных в табл. 1. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (например, mAb22033) и 66/74 (например, mAb22810). Способы и методы идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области и могут использоваться для идентификации CDR в определенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем описании. Примеры соглашений, которые могут использоваться для идентификации границ CDR, включают, например, определение Кабат, определение Чотиа и определение AbM. В общих чертах, определение Кабат основано на изменчивости последовательностей, определение Чотиа основано на расположении структурных петельных областей, а определение AbM является компромиссом между подходами по Кабат и Чотиа. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); and Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989). Также доступны общедоступные базы данных для идентификации последовательностей CDR в антителе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с NPR1, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), причем HCVR содержит (i) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162 и 178; (ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162 и 178; (iii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162 и 178; или (iv) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162 и 178, причем указанная аминокислотная последовательность имеет не более 12 аминокислотных замен; и LCVR содержит (a) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170 и 186; (b) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, и 186; (c) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, и 186; или (d) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170 и 186, причем указанная аминокислотная последовательность имеет не более 10 аминокислотных замен.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение включает антитела, которые специфически связываются с NPR1 агонистическим образом, т.е. потенцируют или индуцируют связывание и/или активность NPR1.

Настоящее изобретение включает анти-NPR1 антитела, имеющие модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть полезна модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или получения антитела, лишённого фрагмента фукозы, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002), JBC 277:26733). В других применениях для изменения комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) может быть выполнена модификация галактозилирования.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые проявляют pH-зависимое связывание с NPR1. Например, настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с NPR1 с более высоким сродством при нейтральном pH, чем при кислом pH (т.е. имеют более низкий уровень связывания при кислом pH).

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые конкурируют за специфическое связывание с NPR1 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, где каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые перекрестно конкурируют за связывание с NPR1 с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, где каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий три CDR HCVR и три CDR LCVR, причем каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к выделенным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые увеличивают или стабилизируют связывание NPR1 с лигандом (например, ANP или BNP). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который активирует связывание NPR1 с ANP, может связываться с тем же эпитопом на NPR1, что и ANP, или может связываться с другим эпитопом на NPR1, что и ANP.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению являются биспецифическими, включая первую специфичность связывания с первым эпитопом NPR1 и вторую специфичность связывания со вторым эпитопом NPR1, при этом первый и второй эпитопы являются разными и неперекрывающимися.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое имеет одну или более из следующих характеристик: (a) является полностью человеческим моноклональным антителом; (b) связывается с мономерным NPR1 человека в отсутствие ANP и/или BNP при 25 и при 37°C с константой диссоциации (K_D) менее 690 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (c) связывается с димерным NPR1 человека в отсутствие ANP или BNP при 25 и при 37°C с K_D менее 42 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (d) связывается с человеческим NPR1 в комплексе с ANP при 25 и 37°C с K_D менее 80 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (e) связывается с человеческим NPR1 в комплексе с BNP при 25 и 37°C с K_D менее 20 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (f) связывается с мономерным NPR1 обезьяны в отсутствие ANP и/или BNP при 25 и 37°C с K_D менее 365 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (g) связывается с димерным NPR1 обезьяны в отсутствие ANP или BNP при 25 и при 37°C с K_D менее 30 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (h) связывается с NPR1 обезьяны в комплексе с ANP при 25 и 37°C с K_D менее 10 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (i) связывается с NPR1 обезьяны в комплексе с BNP при 25 и 37°C с K_D менее 10 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (j) не связывается с мышинным NPR1; (k) связывается с клетками, экспрессирующими человеческий NPR1 (без ANP) или с NPR1, находящимся в комплексе с ANP, с EC_{50} менее 5 нМ; (l) активирует NPR1 с EC_{50} менее 385 нМ, измеренной в биоанализе на основе клеточного потока кальция; (m) снижает системное кровяное давление при введении нормотензивным и гипертензивным мышам, при этом снижение системного и среднего артериального давления продолжается до 28 дней после введения одной дозы; (n) улучшает толерантность к глюкозе при введении мышам с ожирением, вызванным диетой; и (o) содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, и LCVR, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим анти-NPR1 антитела или их части. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичной ей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%,

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

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, где HCVR включает набор из трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено для любого из иллюстративных антител, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, где LCVR включает набор из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено для любого из иллюстративных антител, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности. В некоторых вариантах осуществления согласно этому аспекту изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где HCVR и LCVR происходят от одного и того же анти-NPR1 антитела, перечисленного в табл. 1.

В родственном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, способным экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой и/или легкой цепи антитела. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновых кислот, упомянутых выше, т.е. молекул нуклеиновых кислот, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, указанных в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к векторам экспрессии, содержащим (а) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HCVR антитела, которое связывается с NPR1, причем HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, перечисленных в табл. 1; и/или

(b) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую LCVR антитела, которое связывается с NPR1, причем LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, перечисленных в табл. 1. В объем настоящего изобретения также включены клетки-хозяева, в которые введены такие векторы, и способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела или фрагменты антител, и выделения антител и фрагментов антител, продуцированных таким образом. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева содержат клетку млекопитающего или прокариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO) или клетку *Escherichia coli* (*E.coli*). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, при этом способы включают введение в клетку-хозяина вектора экспрессии, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HCVR и/или LCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, функционально связанную с промотором; культивирование клетки-хозяина в условиях, благоприятных для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты; и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуральной среды и/или клетки-хозяина. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно очистить любым способом, известным в уровне техники.

В третьем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного рекомбинантного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с NPR1, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-NPR1 антитела и второго терапевтического средства. В одном из вариантов осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое преимущественно комбинируют с анти-NPR1 антителом. Примеры средств, которые можно эффективно комбинировать с анти-NPR1 антителом, включают, без ограничения, другие средства, которые связываются с NPR1 и/или активируют NPR1 (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), и/или средства, которые не связываются непосредственно с NPR1, но, тем не менее, лечат или ослабляют по меньшей мере один симптом или признак NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства (раскрытого в другом месте в настоящем описании). Дополнительные комбинированные виды терапии и совместные составы, включающие анти-NPR1 антитела по настоящему изобретению, раскрыты в другом месте в настоящем описании.

В четвертом аспекте изобретение относится к терапевтическим способам лечения NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства у субъекта с помощью анти-NPR1 антитела или антигенсвязывающей части антитела по изобретению, где терапевтические способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по изобретению. Расстройством, подлежащим лечению, представляет собой любое заболевание или состояние, которое может быть облегчено, ослаблено, подавлено или предотвращено за счет усиления активности NPR1 (например, гипертония). В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам профилактики или лечения NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства, включающим введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества анти-NPR1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить с целью профилактики или терапии субъекту, страдающему или имеющему риск развития NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вводят нуждающемуся в этом субъекту в комбинации со вторым терапевтическим средством. Второе терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из антагониста альдостерона, альфа-адреноблокатора, ингибитора ангиотензинпревращающего фермента (ACE), артериолярного вазодилатора, вазодилатора вегетативных ганглиев, бета-адреноблокатора, симпатолитика, истощающего запасы катехоламина, центрального агониста альфа-2-адренорецепторов, блокатора кальциевых каналов, диуретика, ингибитора ренина, антикоагулянта, антитромбоцитарного агента, агента, снижающего уровень холестерина, вазодилатора, дигиталиса, хирургии, имплантируемого устройства, противоопухолевой терапии, инсулина, агониста GLP1, метформина, диализа, стимулятора костного мозга, гемофильтрации, изменения образа жизни, пищевой добавки и любого другого лекарственного вещества или терапевтического средства, известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое помогает противодействовать возникновению или уменьшать любой возможный побочный эффект(ы), связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению, если имеется вероятность возникновения такого побочного эффекта(ов). Антитело или его фрагмент можно вводить подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутрибрюшинно, перорально или внутримышечно. Антитело или его фрагмент можно вводить в дозе от примерно 0,1 до примерно 100 мг/кг веса тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению можно вводить в виде одной или нескольких доз, составляющих от 10 до 600 мг.

Настоящее изобретение также включает применение анти-NPR1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, которое могло бы быть эффективным против активации связывания NPR1 и/или активности NPR1.

Другие варианты осуществления станут очевидными из приведенного ниже подробного описания.

Краткое описание рисунков

На фиг. 1 показано влияние выбранных антител-агонистов NPR1 на систолическое артериальное давление у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем распределяли по группам в зависимости от массы тела. Животным вводили одну подкожную инъекцию 25 мг/кг антитела-агониста NPR1 или контроля PBS, как показано в табл. 30. Все значения представляют собой среднее изменение от исходного уровня в течение 3-7 дней \pm стандартная ошибка среднего (SEM), n=3-9 на группу. Статистический анализ выполняли с помощью одностороннего ANOVA с критерием Даннета; *p<0,05 по сравнению с PBS контролем.

На фиг. 2 показано влияние анти-NPR1 антитела mAb22033 на систолическое артериальное давление у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем случайным образом делили на пять групп с равной массой тела, и им вводили одну подкожную инъекцию mAb22033 в дозах, перечисленных в табл. 32. Антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=4-6 на группу. Статистический анализ выполняли с помощью двустороннего ANOVA с критерием Даннета.

На фиг. 3 показано влияние анти-NPR1 антитела mAb22033 на диастолическое кровяное давление у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем случайным образом делили на пять групп с равной массой тела, и им вводили одну подкожную инъекцию mAb22033 в дозах, перечисленных в табл. 32. Антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=4-6 на группу. Статистический анализ выполняли с помощью двустороннего ANOVA с критерием Даннета.

На фиг. 4 показано влияние анти-NPR1 антитела mAb22033 на частоту сердечных сокращений у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем случайным образом делили на пять групп с равной массой тела, и им вводили одну подкожную инъекцию mAb22033 в дозах, перечисленных в табл. 32. Антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=4-6 на группу. Статистический анализ выполняли с помощью двустороннего ANOVA с критерием Даннета.

На фиг. 5 показано влияние анти-NPR1 антитела mAb22033 на среднее артериальное кровяное давление у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем случайным образом делили на пять групп с равной массой тела, и им вводили одну подкожную инъекцию mAb22033 в дозах, перечисленных в табл. 32. Антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=4-6 на группу. Статистический анализ выполняли с помощью двустороннего ANOVA с критерием Даннета.

На фиг. 6А и 6В показано влияние анти-NPR1 антитела mAb22033 на функцию левого желудочка у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Показаны (фиг. 6А) конечный систолический объем (%); и (фиг. 6В) конечный диастолический объем (%) у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем, распределенных на пять групп с равной массой тела, которым вводили одну подкожную инъекцию mAb22033 в дозах, перечисленных в табл. 32. Антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Эхокардиографию выполняли у анестезированных мышей по короткой оси на 28 день после введения дозы с помощью высокочастотной ультразвуковой системы и зонда. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=6-7 на группу. Статистический анализ выполняли с помощью одностороннего ANOVA с критерием Даннета; *p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем IgG4.

На фиг. 7А и 7В показано влияние анти-NPR1 антитела mAb22033 на функцию левого желудочка у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Показаны (фиг. 7А) фракция укорочения (%); и (фиг. 7В) фракция выброса (%) у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем, распределенных на пять групп с равной массой тела, которым вводили одну подкожную инъекцию mAb22033 в дозах, перечисленных в табл. 32. Антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Эхокардиографию выполняли у анестезированных мышей по короткой оси на 28 день после введения дозы с помощью высокочастотной ультразвуковой системы и зонда. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=6-7 на группу. Статистический анализ выполняли с помощью одностороннего ANOVA с критерием Даннета.

На фиг. 8 показано влияние одной дозы 2 анти-NPR1 антител на систолическое артериальное давление у гипертензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Гипертензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем случайным образом делили на шесть групп с равным систолическим артериальным давлением, и им вводили одну подкожную инъекцию mAb22033 или mAb22810 в дозах, перечисленных в табл. 36. Антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=4-6 на группу. Статистический анализ выполняли с помощью двустороннего ANOVA

На фиг. 16А и 16В показано влияние одной и повторных доз анти-NPR1 антитела на сердечную функцию у гипертензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Показаны (фиг. 16А) конечный систолический объем в % и (фиг. 16В) конечный диастолический объем в % у гипертензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем, распределенных на пять групп с равным систолическим артериальным давлением, которым вводили либо подкожную инъекцию mAb22033 один раз, либо два раза в неделю в течение 3 недель в дозах, перечисленных в табл. 40. Антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Эхокардиографию выполняли на анестезированных мышках по короткой оси на 21 день после введения дозы с помощью высокочастотной ультразвуковой системы и зонда. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=5-6 на группу. Статистический анализ выполняли с помощью одностороннего ANOVA с критерием Даннета.

На фиг. 17А и 17В показано влияние одной и повторных доз анти-NPR1 антитела на сердечную функцию у гипертензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Показаны (фиг. 17А) фракция укорочения (%) и (фиг. 17В) фракция выброса (%) у гипертензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем, распределенных на пять групп с равным систолическим артериальным давлением, которым вводили подкожную инъекцию mAb22033 либо один раз, либо два раза в неделю в течение 3 недель в дозах, перечисленных в табл. 40. Антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Эхокардиографию выполняли на анестезированных мышках по короткой оси на 21 день после введения дозы с помощью высокочастотной ультразвуковой системы и зонда. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=5-6 на группу. Статистический анализ выполняли с помощью одностороннего ANOVA с критерием Даннета.

На фиг. 18А показаны изменения массы тела после введения mAb-агониста NPR1 mAb22810, hFc.FGF21 или mAb изотипического контроля. На фиг. 18В и фиг. 18С показано общее количество жира и общая мышечная масса соответственно после шестинедельной обработки, измеренные с помощью EchoMRI. Ожирения гуманизированных мышей NPR1 добились с помощью 10-недельной диеты с высоким содержанием жиров 60%. После этого периода мышей случайным образом делили на три группы с равной массой тела, и им вводили подкожные инъекции лечебных препаратов в дозах и частотах, перечисленных в табл. 44. Человеческое антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=10 на группу. *P<0,05 по сравнению с изотипическим контролем; **P<0,01 по сравнению с изотипическим контролем. Статистический анализ выполняли с помощью двустороннего ANOVA + Тьюки для веса тела, одностороннего ANOVA + Бонферрони (Bonferroni) для жира и мышечной массы.

На фиг. 19А-19С показаны изменения VO₂ (фиг. 19А), VCO₂ (фиг. 19В) или расхода энергии (фиг. 19С) в разбивке по среднему значению по каждому циклу день/ночь после одной недели обработки либо mAb-агонистом NPR1 mAb22810, hFc.FGF21, либо mAb изотипического контроля. После одной недели обработки мышей из каждой группы помещали в систему метаболических клеток Columbia Instruments (CLAMS) на одну неделю для регистрации параметров метаболизма. Мышам давали время на акклиматизацию в клетках в течение одной недели перед началом измерений, чтобы минимизировать стресс. Человеческое IgG4 антитело использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=5-6 на группу. **P<0,01 по сравнению с изотипическим контролем, ***P<0,001 по сравнению с изотипическим контролем. Статистический анализ выполняли с помощью одностороннего ANOVA + Бонферрони.

На фиг. 20А показано изменение толерантности к глюкозе, измеренное с помощью перорального теста толерантности к глюкозе (2 г/кг глюкозы) после двухнедельной обработки либо mAb-агонистом NPR1 mAb22810, hFc.FGF21, либо mAb изотипического контроля.

На фиг. 20В показаны уровни глюкозы после ночного голодания, зарегистрированные в начале исследования в А. После двухнедельной обработки мышей из каждой группы не кормили в течение ночи в чистых клетках и на следующее утро давали пероральную нагрузку глюкозы 2 г/кг. Затем уровень глюкозы регистрировали в хвостовой вене с помощью ручного глюкометра в T0, T15, T30, T60, T90 и T120. Человеческое IgG4 антитело использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=10 на группу. Группа hFc.FGF21: **P<0,01 по сравнению с изотипическим контролем, ***P<0,001 по сравнению с изотипическим контролем, ****P<0,0001 по сравнению с изотипическим контролем. Группа mAb22810: ++P<0,01 по сравнению с изотипическим контролем. Статистический анализ выполняли с помощью двустороннего ANOVA + Бонферрони для oGTT, одностороннего ANOVA + Бонферрони для глюкозы натощак.

На фиг. 21А показано изменение массы тела после введения mAb-агониста NPR1 mAb22033, hFc.FGF21, либо mAb изотипического контроля.

На фиг. 21В и 21С показаны общий уровень жира и общая мышечная масса, соответственно, после шестинедельной обработки, измеренные с помощью EchoMRI. Ожирения гуманизированных мышей NPR1 добились с помощью 10-недельной диеты с высоким содержанием жиров 60%. После этого периода мышей случайным образом делили на три группы с одинаковой массой тела, и им вводили подкожные инъекции лечебных препаратов в дозах и частотах, перечисленных в табл. 45. Человеческое IgG4 антите-

ло использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, $n=10$ на группу. * $P<0,05$ по сравнению с изотипическим контролем, **** $P<0,0001$ по сравнению с изотипическим контролем. Статистический анализ выполняли с помощью двустороннего ANOVA + Тьюки для массы тела, одностороннего ANOVA + Бонферонни для жира и мышечной массы.

На фиг. 22A-22C показаны изменения VO_2 (фиг. 22A), VCO_2 (фиг. 22B) или расхода энергии (фиг. 22C) в разбивке по среднему значению по каждому циклу день/ночь после однонедельной обработки mAb-агонистом NPR1 mAb22033, hFc.FGF21 или mAb изотипического контроля. После однонедельной обработки мышей из каждой группы помещали в систему метаболических клеток Columbia Instruments (CLAMS) на одну неделю для регистрации параметров метаболизма. Мышам давали время для акклиматизации в клетках в течение одной недели перед проведением измерений, чтобы минимизировать стресс. Человеческое IgG4 антитело использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, $n=5-6$ на группу. **** $P<0,0001$ по сравнению с изотипическим контролем. Статистический анализ выполняли с помощью одностороннего ANOVA+Бонферонни.

На фиг. 23A и 23B показано влияние анти-NPR1 антитела mAb22033 на толерантность к глюкозе, определенную по уровням глюкозы в крови (фиг. 23A) и глюкозы натошак (фиг. 23B). После четырехнедельной обработки мышей из каждой группы не кормили в течение ночи в чистых клетках и на следующее утро давали пероральную нагрузку глюкозы 2 г/кг. Затем уровень глюкозы регистрировали в хвостовой вене с помощью ручного глюкометра в T0, T15, T30, T60, T90 и T120. Человеческое IgG4 антитело использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, $n=10$ на группу. Группа hFc.FGF21: *** $P<0,001$ по сравнению с изотипическим контролем, **** $P<0,0001$ по сравнению с изотипическим контролем. Группа mAb22033: + $P<0,05$ по сравнению с изотипическим контролем, ++ $P<0,01$ по сравнению с изотипическим контролем. Статистический анализ выполняли с помощью двустороннего ANOVA + Бонферонни для oGTT, одностороннего ANOVA + Бонферонни для глюкозы натошак.

Подробное описание изобретения

Перед описанием способов по настоящему изобретению следует иметь в виду, что это изобретение не ограничено конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут меняться. Также следует понимать, что используемая в настоящем описании терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют те же значения, в которых их обычно понимает специалист в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя на практике или при тестировании настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь, ниже описаны предпочтительные методы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем описании, полностью включены в него посредством ссылки.

Определения

Термин "NPR1", также упоминаемый как "NPR1A", относится к рецептору натрийуретического пептида 1 (также известному как рецептор натрийуретического пептида A). NPR1 представляет собой гомодимерную трансмембранную гуанилатциклазу, фермент, катализирующий синтез cGMP. NPR1 является рецептором как предсердных (ANP), так и мозговых (BNP) натрийуретических пептидов и претерпевает конформационные изменения во внеклеточном домене при связывании лиганда (Ogawa et al. 2004, J. Biol. Chem. 279:28625-31). Белок имеет четыре отдельных участка, включающих внеклеточный лиганд-связывающий домен, единичную спиральную трансмембранную область, внутриклеточный протеинкиназоподобный домен гомологии и каталитический домен гуанилилциклазы. Аминокислотная последовательность полноразмерного белка NPR1 представлена аминокислотной последовательностью, приведенной в UniProtKB/Swiss-Prot под номером доступа P16066.1 (SEQ ID NO: 193). Термин "NPR1" включает рекомбинантный белок NPR1 или его фрагмент. Термин также охватывает белок NPR1 или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, мышинным или человеческим Fc или сигнальной последовательностью, такой как ROR1 (например, SEQ ID NO: 194-199).

В контексте настоящего описания термин "антитело" предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями (т.е. "полноразмерных молекул антител"), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной 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 переменной области легкой цепи ("LCVR или V_L") и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), с вкраплениями областей, которые являются более консервативными, называемых

каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В некоторых вариантах осуществления изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны последовательностям человеческой зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным или искусственным образом. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе анализа двух или более CDR.

Также возможна замена одного или более остатков CDR или пропуск одного, или более CDR. В научной литературе описаны антитела, в которых связывание возможно без одной или двух CDR. Padlan et al. (1995, FASEB J. 9:133-139) проанализировали контактные области между антителами и их антигенами, основываясь на опубликованных кристаллических структурах, и пришли к выводу, что только от одной пятой до одной трети остатков CDR действительно контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил большое количество антител, в которых одна или две CDR не содержат аминокислоты, контактирующие с антигеном (см. также Vajdos et al., 2002, J. Mol. Biol. 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, могут быть идентифицированы на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются) областей CDR по Кабат, лежащих вне CDR по Чотиа, с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем. Если CDR или его остаток(и) опущены, его обычно заменяют аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности человеческого антитела или консенсусных последовательностях таких последовательностей. Положения для замены в CDR и заменяемые аминокислоты также можно выбрать эмпирически. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными.

Полностью человеческие моноклональные анти-NPR1 антитела, раскрытые в настоящем описании, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем описании, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем описании, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областях CDR мутированы в соответствующий остаток(и) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток(и) другой последовательности зародышевой линии человека, или имеют консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в настоящем описании обозначены общим термином "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящем описании, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все остатки каркасной области и/или CDR в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно до остатков, обнаруженных в исходной последовательности зародышевой линии, из которой произошло антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутированы обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков каркасной области и/или CDR мутированы в соответствующий остаток(и) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально было получено антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасной и/или CDR областей, например в которых определенные отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на наличие одного или более требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенное сродство связывания, улучшенные или усиленные антагонистические биологические свойства, пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким образом, включены в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также включает полностью человеческие моноклональные анти-NPR1 антитела, содержащие варианты любой из раскрытых в настоящем описании аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющие одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает анти-NPR1 антитела, 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. консер-

вативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем описании.

Термин "человеческое антитело" или "полностью человеческое антитело" в контексте настоящего описания включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии. Человеческие mAb по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако используемый в настоящем описании термин "человеческое антитело" или "полностью человеческое антитело" не предназначен для включения моноклональных антител, в которых к человеческой FR последовательности привиты последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши). Этот термин включает антитела, которые рекомбинантно продуцируются у млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Термин не предназначен для включения антител, выделенных или продуцированных в организме человека.

Термин "рекомбинантный" в контексте настоящего описания относится к антителам по изобретению или их антигенсвязывающим фрагментам, созданным, экспрессированным, выделенным или полученным с помощью технологий или способов, известных в данной области как методы рекомбинантной ДНК, которые включают, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Этот термин относится к антителам, экспрессируемым у млекопитающего, не являющегося человеком (включая трансгенных млекопитающих, не являющихся человеком, например, трансгенных мышей), или в системе экспрессии клеток (например, клеток CHO) или выделенных из библиотеки рекомбинантных комбинаторных антител человека.

Термин "специфически связывается" или "специфически связывается с" и т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Специфическое связывание может быть охарактеризовано константой равновесной диссоциации, составляющей по меньшей мере примерно 1×10^{-8} М или менее (например, более низкое значение K_D означает более сильное связывание). Способы определения, связываются ли две молекулы специфически, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Раскрытые в настоящем описании антитела, которые специфически связываются с NPR1, идентифицировали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™. Более того, полиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в NPR1 и одним или более дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя разными областями NPR1, в контексте настоящего описания также считаются антителами, которые "связываются специфически".

Термин "антитело с высоким сродством" относится к тем mAb, которые имеют сродство связывания с NPR1, выраженное в виде K_D , составляющее по меньшей мере 10^{-8} М; предпочтительно 10^{-9} М; более предпочтительно 10^{-10} М, даже более предпочтительно 10^{-11} М, измеренное методом поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™ или ELISA для определения сродства в растворе.

Термин "медленная скорость диссоциации", " K_{off} " или " k_d " означает антитело, которое диссоциирует из комплекса с NPR1 с константой скорости 1×10^{-3} с⁻¹ или менее, предпочтительно 1×10^{-4} с⁻¹ или менее, определенной методом поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™.

Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. в контексте настоящего описания включают любой природный, ферментативно получаемый, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" в контексте настоящего описания относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с белком NPR1.

В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагменты антитела по изобретению могут быть конъюгированы с таким фрагментом, как лиганд, или терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), вторым анти-NPR1 антителом или любым другим терапевтическим фрагментом, пригодным для лечения NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства.

Термин "выделенное антитело" в контексте настоящего описания означает антитело, которое по существу не содержит других антител (Ab), имеющих другую антигенную специфичность (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с NPR1, или его фрагмент, практически не содержит Ab, которые специфически связываются с антигенами, отличными от NPR1).

Термин "активирующее антитело" или "антитело-агонист" в контексте настоящего описания (или "антитело, которое увеличивает или усиливает активность NPR1" или "антитело, которое стабилизирует активированную конформацию") означает антитело, которое при связывании с NPR1 приводит к активации по меньшей мере одной биологической активности NPR1. Например, антитело по изобретению может снижать системное артериальное давление при введении нуждающемуся в этом субъекту.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс" в контексте настоящего описания относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать биомолекулярные взаимодействия в реальном времени путем обнаружения изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например, с помощью системы BIACORE™. (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

Термин "K_D", используемый в настоящем описании, обозначает константу равновесной диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим участком в варибельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и иметь разные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к участку антигена, на который отвечают В- и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, которая связывается с антителом. Эпитопы можно определить как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно представляют собой подмножество структурных эпитопов и имеют те остатки, которые непосредственно вносят вклад в сродство взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, т.е. состоять из нелинейных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в определенных вариантах осуществления могут иметь определенные трехмерные структурные характеристики и/или характеристики удельного заряда.

Термин "перекрестно конкурирует" в контексте настоящего описания означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном и ингибирует или блокирует связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Термин также включает конкуренцию между двумя антителами в обоих направлениях, т.е. первое антитело, которое 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, так что связывание одного антитела ингибирует или блокирует связывание второго антитела, например, в результате стерических затруднений. Перекрестная конкуренция между антителами может быть измерена способами, известными в данной области, например методом биослойной интерферометрии в реальном времени без метки. Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена как связывание второго антитела, которое меньше фонового сигнала из-за связывания "с таким же антителом" (где первое и второе антитела представляют собой одно и то же антитело). Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена, например, в виде % связывания второго антитела, который меньше, чем исходное фоновое связывание "с таким же антителом" (где первое и второе антитела представляют собой одно и то же антитело).

Термин "значительная степень идентичности" или "по существу идентичный", когда относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью) идентичность нуклеотидных последовательностей составляет по меньшей мере примерно 90% и более предпочтительно по меньшей мере примерно 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, измеренная любым известным алгоритмом идентичности последовательностей, таким как FASTA, BLAST или GAP, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая значительную степень идентичности с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в некоторых случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или практически аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "значительная степень сходства" или "по существу аналогичный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, в которых по умолчанию используются штрафы за пробелы, имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере 95, 98 или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно, чтобы положения остатков, которые не являются идентичными, различались консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" означает замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена не изменяет функциональные свойства белка существенным образом. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства может быть подогнана для внесения поправки на консервативный характер замены. Средства осуществления этой подгонки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994), *Methods Mol. Biol.* 24:307-331, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) боковые цепи, содержащие амид:

аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992), *Science*, 256:1443-45, включенной в настоящее описание посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена является любым изменением, имеющим неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей полипептидов обычно измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков позволяет сопоставлять аналогичные последовательности, используя меры сходства, относящиеся к различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, пакет программ GCG содержит такие программы, как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантным вариантом. См., например, GCG версии 6.1. Последовательности полипептидов также можно сравнивать с помощью FASTA, используя параметры по умолчанию или рекомендованные параметры; программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процент идентичности последовательностей областей с наилучшим перекрытием между запрашиваемой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из 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 посредством ссылки.

Фраза "терапевтически эффективное количество" подразумевает количество, которое обеспечивает требуемый эффект, ради которого оно вводится. Точное количество будет зависеть от цели лечения и может быть установлено специалистом в данной области с помощью известных методов (см., например, Lloyd (1999), *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

В контексте настоящего описания термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, нуждающемуся в улучшении, профилактике и/или лечении NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства, такого как гипертония. Термин включает людей, которые имеют или находятся в группе риска развития такого заболевания или расстройства.

В контексте настоящего описания термины "лечить", "лечащий" или "лечение" относятся к уменьшению или облегчению тяжести по меньшей мере одного симптома или признака NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства благодаря введению нуждающемуся в этом субъекту терапевтического агента, такого как антитело по настоящему изобретению. Эти термины включают ингибирование прогрессирования заболевания или ухудшения симптома/признака. Термины также включают положительный прогноз заболевания, т.е. субъект может не иметь заболевания или заболевание может быть облегчено после введения терапевтического агента, такого как антитело по настоящему изобретению. Терапевтический агент можно вводить субъекту в терапевтической дозе.

Термины "предотвращать", "предотвращающий" или "профилактика" относятся к ингибированию проявления NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства, или любых симптомов или признаков такого заболевания или расстройства при введении антитела по настоящему изобретению.

Антигенсвязывающие фрагменты антител.

Если специально не указано иное, термин "антитело", используемый в настоящем описании, следует понимать как охватывающий молекулы антитела, содержащие две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (т.е. "полноразмерные молекулы антитела"), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. в контексте настоящего описания включают любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" в контексте настоящего описания относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с белком NPR1. Фрагмент антитела может включать Fab-фрагмент, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. В некоторых вариантах осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту полиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антитела с помощью любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление, или методов рекомбинантной генной инженерии, включающих манипуляцию и экс-

прессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и подвержена химическим манипуляциям или манипуляциям методами молекулярной биологии, например, для размещения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию, или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) Fab-фрагменты; (ii) фрагменты $F(ab')_2$; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как CDR3 пептид), или пептид FR3-CDR3-FR4 с ограниченной конформационной свободой. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, мини-тела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические препараты (SMTP) и переменные домены IgNAR акулы также охвачены выражением "антигенсвязывающий фрагмент", используемым в настоящем описании.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или любой аминокислотный состав и обычно содержит по меньшей мере одну CDR, которая примыкает к одной или более каркасным последовательностям или находится с ними в одной рамке считывания. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H , V_H-V_L или V_L-V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые возможны в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной, или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что обеспечивает гибкую или полугибкую связь между соседними переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может включать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными V_H или V_L доменами (например, посредством дисульфидной связи(ей)).

Как и в случае с полноразмерными молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат полиспецифического антитела, включая иллюстративные форматы биспецифического антитела, раскрытые в настоящем описании, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с помощью стандартных методов, доступных в данной области.

Получение человеческих антител.

Способы получения человеческих антител в трансгенных мышах известны в данной области. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с NPR1.

Для генерации антител к белку NPR1 можно использовать иммуноген, содержащий любое из следующего. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению получают, используя мышей, иммунизированных полноразмерным нативным белком NPR1 (см., например, UniProtKB/Swiss-Prot, номер доступа P16066.1) или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. Альтернативно, белок или его фрагмент можно получить с помощью стандартных биохимических методов, модифицировать и использовать в качестве иммуногена.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный белок NPR1 или его фрагмент, экспрессируемый в *E.coli* или в любых других эукариотических клетках или

клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, SEQ ID NO: 194-199).

Используя технологию VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любой другой известный способ получения моноклональных антител, сначала выделяют химерные антитела с высоким сродством к NPR1, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, геном которой содержит человеческие переменные области тяжелой и легкой цепи, функционально связанные с эндогенными локусами мышинной константной области, так что в ответ на антигенную стимуляцию мышь продуцирует антитело, содержащее человеческую переменную область и мышиную константную область. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепей. Затем выполняют экспрессию ДНК в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Как правило, VELOCIMMUNE® мышью заражают представляющим интерес антигеном и у мышей, экспрессирующих антитела, выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки). Лимфатические клетки могут быть слиты с линией клеток миеломы для получения бессмертной гибридной клеточной линии, и такие гибридные клеточные линии подвергают скринингу и отбору для идентификации гибридных клеточных линий, которые продуцируют антитела, специфичные к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с требуемыми изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может продуцироваться в клетке, такой как клетка CHO. Альтернативно, ДНК, кодирующая антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Первоначально выделяют химерные антитела с высоким сродством, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Как и в экспериментальном разделе ниже, антитела характеризуют и выбирают по наличию требуемых характеристик, включая сродство, селективность, эпитоп и т.д. Мышьи константные области заменяют требуемой человеческой константной областью для получения полностью человеческого антитела по изобретению, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Хотя выбранная константная область может меняться в зависимости от конкретного применения, характеристики связывания с антигеном с высоким сродством и целевой специфичности локализованы в переменной области.

Биоэквиваленты.

Анти-NPR1 антитела и фрагменты антител по настоящему изобретению включают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых описанных антител, но которые сохраняют способность связываться с белком NPR1. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК, кодирующие антитело по настоящему изобретению, включают последовательности, которые содержат одно или более добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которое по существу биоэквивалентно антителу или фрагменту антитела по изобретению.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, которые не различаются существенным образом по скорости и степени абсорбции при введении в одинаковой молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях либо в виде одной дозы, либо в виде нескольких доз. Некоторые антитела могут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени абсорбции, но не по скорости абсорбции, и все еще могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в маркировке, и для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме не являются важными, например, при длительном применении, и считаются незначительными с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если у них отсутствуют клинически значимые различия по их безопасности, чистоте или активности.

В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно переключить один или несколько раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности, по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия в отношении условия или

условий применения в той степени, в которой известны такие механизмы.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью *in vivo* и/или *in vitro* методов. Меры биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию времени; (b) тест *in vitro*, который коррелировал с данными био-доступности *in vivo* для человека и позволяет обоснованно прогнозировать такую био-доступность; (c) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют как функцию времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, которое устанавливает безопасность, эффективность, био-доступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител по изобретению могут быть сконструированы, например, путем введения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не требуются для биологической активности. Например, остатки цистеина, не существенные для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Анти-NPR1 антитела, содержащие Fc-варианты.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения предоставлены анти-NPR1 антитела, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает анти-NPR1 антитела, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, при этом мутация(и) увеличивает сродство Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от примерно 5,5 до примерно 6,0). Такие мутации могут привести к увеличению периода полувыведения антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc-фрагмента 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).

Например, настоящее изобретение включает анти-NPR1 антитела, 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 вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в переменных доменах антител, раскрытых в настоящем описании, рассмотрены в рамках настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает анти-NPR1 антитела, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C_H), где химерная область C_H включает сегменты, происходящие из областей C_H более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела по изобретению могут содержать химерную область C_H, содержащую часть или весь домен C_H2, полученный из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в комбинации с частью или всем доменом C_H3, полученным из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по изобретению содержат химерный участок C_H, имеющий химерный шарнирный участок. Например, химерный шарнир может содержать "верхнюю шарнирную" аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки от положений 216 до 227 согласно нумерации EU), полученную из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в комбинации с "нижней шарнирной" последовательностью (аминокислотные остатки от положений 228 до 236 согласно нумерации EU), полученной из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхней шарнирной области человеческого IgG1 или человеческого IgG4, и аминокислотные остатки, полученные из нижней шарнир-

ной области человеческого IgG2. Антитело, содержащее химерный участок C_H , согласно настоящему описанию, в некоторых вариантах осуществления может проявлять эффекторные функции модифицированного Fc-фрагмента без неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, публикацию заявки на патент США 2014/0243504, раскрытие которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки).

Биологические характеристики антител.

Обычно антитела по настоящему изобретению действуют путем связывания с белком NPR1 и повышения его активности. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с человеческим мономерным белком NPR1 в отсутствие ANP или BNP (например, при 25 или 37°C) с K_D менее 690 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенном в примере 3 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 с K_D менее примерно 650 нМ, менее примерно 500 нМ, менее примерно 400 нМ, менее примерно 300 нМ, менее примерно 200 нМ, менее примерно 100 нМ, менее примерно 50 нМ или менее примерно 25 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенном в примере 3 в настоящем описании, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с человеческим димерным белком NPR1 в отсутствие ANP или BNP (например, при 25 или 37°C) с K_D менее 42 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенном в примере 3 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 с K_D менее примерно 40 нМ, менее примерно 30 нМ, менее примерно 20 нМ, менее примерно 10 нМ, менее примерно 5 нМ, менее примерно 1 нМ или менее примерно 0,5 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенном в примере 3 настоящего описания, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с человеческим белком NPR1 в комплексе с ANP (например, при 25 или 37°C) с K_D менее 80 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенного в примере 3 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 с K_D менее примерно 70 нМ, менее примерно 50 нМ, менее примерно 25 нМ, менее примерно 10 нМ, менее примерно 5 нМ, менее примерно 1 нМ или менее примерно 0,5 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенного в примере 3 настоящего описания, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с человеческим белком NPR1 в комплексе с BNP (например, при 25 или 37°C) с K_D менее 20 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенного в примере 3 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 с K_D менее примерно 15 нМ, менее примерно 10 нМ, менее примерно 5 нМ, менее примерно 1 нМ или менее примерно 0,5 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенного в примере 3 настоящего описания, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с мономерным белком NPR1 обезьяны в отсутствие ANP или BNP (например, при 25 или 37°C) с K_D менее 365 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенного в примере 3 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 с K_D менее примерно 360 нМ, менее примерно 300 нМ, менее примерно 150 нМ, менее примерно 100 нМ, менее примерно 50 нМ, менее примерно 25 нМ, менее примерно 10 нМ, менее примерно 5 нМ, менее примерно 1 нМ или менее примерно 0,5 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенного в примере 3 настоящего описания, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с димерным белком NPR1 обезьяны в отсутствие ANP или BNP (например, при 25 или 37°C) с K_D менее 30 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенного в примере 3 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 с K_D менее примерно 20 нМ, менее примерно 10 нМ, менее примерно 5 нМ, менее примерно 1 нМ или менее примерно 0,5 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенного в примере 3 настоящего описания, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с белком NPR1 обезьяны в комплексе с ANP (например, при 25 или 37°C) с K_D менее 10 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенного в примере 3 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 с K_D менее примерно 9 нМ, менее примерно 8 нМ, менее примерно 5 нМ, менее примерно 1 нМ или менее примерно 0,5 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенного в примере 3 настоящего описания, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с димерным белком NPR1 обезьяны в комплексе с BNP (например, при 25 или 37°C) с K_D менее 10 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенного в примере 3 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 с K_D менее примерно 9 нМ, менее примерно 8 нМ, менее примерно 5 нМ, менее примерно 1 нМ или менее примерно 0,5 нМ, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенного в примере 3 настоящего описания, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с клетками, экспрессирующими человеческий NPR1 с ANP или без него при EC_{50} менее 5 нМ, менее 4 нМ, менее 3 нМ, менее 2 нМ, менее 1 нМ или менее 0,5 нМ, измеренной, например, в формате анализа, описанного ниже в примере 5, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые активируют NPR1 с EC_{50} менее 385 нМ, измеренной с помощью биоанализа на основе клеточного потока кальция, например, в формате анализа, определенного в примере 6 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты активируют NPR1 с EC_{50} менее примерно 300 нМ, менее примерно 200 нМ, менее примерно 100 нМ, менее примерно 50 нМ, менее примерно 10 нМ или менее примерно 1 нМ, измеренной с помощью биоанализа на основе клеточного потока кальция, например, в формате анализа, определенного в примере 6 настоящего описания, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с NPR1 и снижают системное артериальное давление у субъекта на более чем 28 дней при введении нуждающемуся в этом субъекту в виде одной дозы, например, как описано ниже в примере 8.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с NPR1 и снижают уровни глюкозы в крови натощак при введении нуждающемуся в этом субъекту, например, как описано ниже в примере 11.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с белком NPR1 в присутствии или в отсутствие ANP или BNP и увеличивает активность NPR1, где антитело или его фрагмент проявляет одну или более из следующих характеристик: (a) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело; (b) связывается с человеческим мономерным NPR1 в отсутствие ANP и/или BNP при 25 и при 37°C с константой диссоциации (K_D) менее 690 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (c) связывается с человеческим димерным NPR1 в отсутствие ANP или BNP при 25 и при 37°C с K_D менее 42 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (d) связывается с человеческим NPR1 в комплексе с ANP при 25 и 37°C с K_D менее 80 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (e) связывается с человеческим NPR1 в комплексе с BNP при 25 и 37°C с K_D менее 20 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (f) связывается с мономерным NPR1 обезьяны в отсутствие ANP и/или BNP при 25 и 37°C с K_D менее 365 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (g) связывается с димерным NPR1 обезьяны в отсутствие ANP или BNP при 25 и при 37°C с K_D менее 30 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (h) связывается с NPR1 обезьяны в комплексе с ANP при 25 и 37°C с K_D менее 10 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (i) связывается с NPR1 обезьяны в комплексе с BNP при 25 и 37°C с K_D менее 10 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (j) не связывается с мышинным NPR1; (k) связывается с клетками, экспрессирующими человеческий NPR1 (в отсутствие ANP) или комплексом NPR1-ANP с EC_{50} менее 5 нМ; (l) активирует NPR1 с EC_{50} менее 385 нМ, измеренной в биоанализе на основе клеточного потока кальция; (m) снижает системное артериальное давление при введении мышам с нормальным и гипертензивным давлением, при этом снижение системного и среднего артериального давления продолжается до 28 дней после введения одной дозы; (n) улучшает толерантность к глюкозе при введении мышам с ожирением, вызванным диетой; и (o) содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности HCVR, приведенной в табл. 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1.

Антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или более из вышеупомянутых биологических характеристик или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны специалисту в данной области из обзора настоящего изобретения, включая приведенные в настоящем описании рабочие примеры.

Картирование эпитопа и родственные технологии.

Настоящее изобретение включает анти-NPR1 антитела, которые взаимодействуют с одной или более аминокислотами, присутствующими в одной или более областях молекулы белка NPR1. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной 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, расположенных в любом из вышеупомянутых доменов молекулы белка NPR1 (например, линейный эпитоп в домене). Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных внутри одного или обоих вышеупомянутых доменов белковой молекулы (например, конформационный эпитоп).

Для определения того, "взаимодействует ли антитело с одной или более аминокислотами" в полипептиде или белке, можно использовать различные методы, известные специалистам в данной области. Примеры методов включают, например, рутинные анализы перекрестного блокирования, такие как описанные в Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие методы включают мутационный анализ методом аланинового сканирования, блот-анализ пептидов (Reineke (2004), *Methods Mol. Biol.* 248:443-63), анализ расщепления пептидных связей, кристаллографические исследования и анализ ЯМР. Кроме того, можно использовать такие методы, как удаление эпитопа, выделение эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000), *Prot. Sci.* 9:487-496). Другой метод, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, представляет собой обмен водород/дейтерий, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, и обмениваемые протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом антител, подвергаются обратному обмену дейтерия-на-водород с меньшей скоростью, чем обмениваемые протоны в аминокислотах, которые не являются частью интерфейса. В результате аминокислоты, которые образуют часть интерфейса белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, следовательно, будут иметь относительно более высокую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в интерфейс. После диссоциации антитела целевой белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999), *Analytical Biochemistry*, 267:252-259; Engen and Smith (2001), *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к участку антигена, на который отвечают В-и/или Т-клетки. Эпитопы В-клеток могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, наложенных друг на друга благодаря третичной укладке белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии на них денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные в результате третичной укладки, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Определение профиля путем модификации (MAP), также известное как определение профиля антител на основе структуры антигена (ASAP), представляет собой метод, который позволяет классифицировать большое количество моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, в соответствии со сходством профиля связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигена (см. US 2004/0101920, специально включенный в настоящее описание во всей своей полноте посредством ссылки). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, который либо явно отличается от эпитопа, представленного другой категорией, либо частично перекрывается с ним. Эта технология позволяет быстро фильтровать генетически идентичные антитела, так что характеристика может быть сосредоточена на генетически отличных антителах. Применительно к скринингу гибридом MAP может облегчить идентификацию редких гибридомных клонов, которые продуцируют mAb, имеющие требуемые характеристики. MAP можно использовать для сортировки антител по изобретению на группы антител, связывающихся с разными эпитопами.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает анти-NPR1 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с одним или более эпитопами, обнаруженными во внеклеточном домене NPR1. Эпитоп(ы) может 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, расположенных во внеклеточном домене NPR1. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных внутри NPR1.

Настоящее изобретение включает анти-NPR1 антитела, которые связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любое из конкретных типичных антител, перечисленных в табл. 1. Аналогично, настоящее изобретение также включает анти-NPR1 антитела, которые конкурируют для связывания с белком NPR1 или его фрагментом с любым из конкретных иллюстративных антител, перечисленных в табл. 1. Например, настоящее изобретение включает анти-NPR1 антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с белком NPR1 с одним или более антителами, перечисленными в табл. 1.

С помощью стандартных методов, известных в данной области, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное анти-NPR1 антитело, или конкурирует за связывание с ним. Например, для определения, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное анти-NPR1 антитело по изобретению, обеспечивают возможность для связывания эталонного антитела с белком или пептидом NPR1 в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой белка NPR1. Если тестируемое антитело способно связываться с NPR1 после насыщения связывания с эталонным анти-NPR1 антителом, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, отличным от эпитопа эталонного анти-NPR1 антитела. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с белком NPR1 после насыщения связывания с эталонным анти-NPR1 антителом, тогда тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный эталонным анти-NPR1 антителом по изобретению.

Для определения, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным анти-NPR1 антителом, описанный выше метод связывания выполняют в двух направлениях: в первом случае, обеспечивают возможность для связывания эталонного антитела с белком NPR1 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой NPR1. Во втором случае, обеспечивают возможность для связывания тестируемого антитела с молекулой NPR1 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой NPR1. Если в обоих направлениях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой NPR1, то делают вывод, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с NPR1. Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно может связываться с эпитопом, идентичным для эталонного антитела, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающего или соседнего эпитопа.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающим эпитопом, если каждое из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого антитела с антигеном. Иными словами, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, предпочтительно на 75, 90 или даже на 99%, как измерено с помощью анализа конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990, 50:1495-1502). Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если практически все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Затем могут быть выполнены дополнительные стандартные эксперименты (например, анализ пептидных мутаций и анализ связывания) для подтверждения, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела происходит из-за связывания с тем же эпитопом, с которым связывается и эталонное антитело, или причиной отсутствия наблюдаемого связывания является стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода могут быть выполнены с помощью ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с белком-рецептором натрийуретического пептида 1 (NPR1), причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с одной или более аминокислотами, содержащимися во внеклеточном домене NPR1 (аминокислоты 29-347 SEQ ID NO: 194), определенными обменом водород/дейтерий, и причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (i) связывается с клетками, экспрессирующими человеческий NPR1 в присутствии или в отсутствие предсердного натрийуретического пептида (ANP); и/или (ii) связывается с NPR1 и активирует NPR1. В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из (a) аминокислот 29-45 SEQ ID NO: 194; (b) аминокислот 331-347 SEQ ID NO: 194; (c) аминокислот 336-347 SEQ ID NO: 194; (d) аминокислот 331-335 SEQ ID NO: 194 и (e) аминокислот 70-81 SEQ ID NO: 194. В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из (a) аминокислот 29-45 SEQ ID NO: 194 и (b) аминокислот 336-347 SEQ ID NO: 194. В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из (a) аминокислот 29-45 SEQ ID NO: 194 и (b) аминокислот 331-347 SEQ ID NO: 194, в присутствии ANP. В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из (a) аминокислот 29-45 SEQ ID NO: 194; (b) аминокислот 70-81 SEQ ID NO: 194; и (c) аминокислот 331-335 SEQ ID NO: 194, в присутствии ANP. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение предоставлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком NPR1 в присутствии ANP, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из (a) аминокислот 29-45 SEQ ID NO: 194 и (b) аминокислот 331-347

SEQ ID NO: 194, но не с аминокислотами 70-81 SEQ ID NO: 194, согласно определению с помощью обмена водород/дейтерий, и причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (i) связывается с клетками, экспрессирующими человеческий NPR1, в присутствии или в отсутствие ANP; и/или (ii) связывается с NPR1 и активирует NPR1.

Иммуноконъюгаты.

Изобретение включает человеческое моноклональное анти-NPR1 антитело, конъюгированное с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), для лечения NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства (например, гипертензии). Используемый в настоящем описании термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое химически или биологически связано с радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, мишенью или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом или белком или терапевтическим агентом. Антитело может быть связано с радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, фрагментом-мишенью или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом или терапевтическим агентом в любом месте молекулы, если оно способно связываться со своей мишенью. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитело-лекарственное средство и слитые белки антитело-токсин. В одном из вариантов осуществления агент может представлять собой второе антитело к белку NPR1. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с анти-NPR1 антителом, выбирают с учетом состояния, подлежащего лечению, и требуемого терапевтического эффекта, который должен быть достигнут. Примеры подходящих агентов для образования иммуноконъюгатов известны в данной области; см., например, WO 05/103081.

Полиспецифические антитела.

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут быть специфическими по отношению к разным эпитопам одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические по отношению к более чем одному полипептиду-мишени. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

Любая из полиспецифических антигенсвязывающих молекул по изобретению или их вариантов может быть сконструирована с помощью стандартных молекулярно-биологических методов (например, рекомбинантной ДНК и технологии экспрессии белка), известных специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления NPR1-специфические антитела создают в биспецифическом формате ("биспецифические"), в котором переменные области, связывающиеся с отдельными доменами белка NPR1, связаны вместе, что обеспечивает двухдоменную специфичность в пределах одной связывающей молекулы. Правильно сконструированные биспецифические препараты могут повысить общую эффективность ингибирования NPR1-белка за счет увеличения как специфичности, так и avidности связывания. Переменные области со специфичностью к отдельным доменам (например, сегментам N-концевого домена) или которые могут связываться с разными областями внутри одного домена, объединяют в пары на структурном каркасе, что позволяет каждой области связываться одновременно с отдельными эпитопами, или в разных областях внутри одного домена. В одном из примеров для получения биспецифичности переменные области тяжелой цепи (V_H) из связывающего вещества со специфичностью по отношению к одному домену рекомбинируют с переменными областями легкой цепи (V_L) из серии связывающих веществ со специфичностью по отношению ко второму домену, чтобы идентифицировать неродственные партнеры V_L , которые могут быть спарены с исходной V_H , не нарушая исходной специфичности к этой V_H . Таким образом, один сегмент V_L (например, V_{L1}) может быть объединен с двумя разными доменами V_H (например, V_{H1} и V_{H2}) для создания биспецифической молекулы, состоящей из двух связывающих "плеч" ($V_{H1}-V_{L1}$ и $V_{H2}-V_{L1}$). Использование одного сегмента V_L снижает сложность системы и, таким образом, упрощает и увеличивает эффективность процессов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для создания биспецифического антитела (см., например, US 2011/0195454 и US 2010/0331527).

Альтернативно, антитела, которые связываются с более чем одним доменом и второй мишенью, такой как, без ограничения, например, вторым другим анти-NPR1 антителом, могут быть получены в биспецифическом формате с помощью представленных в настоящем описании методов или других методов, известных специалистам в данной области. Переменные области антитела, связывающиеся с разными областями, могут быть связаны вместе с переменными областями, которые связываются с соответствующими участками, например на внеклеточном домене NPR1, для придания двойной антигенной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Правильно сконструированные биспецифичности такого характера выполняют двойную функцию. Переменные области со специфичностью к внеклеточному домену объединяют с переменной областью со специфичностью вне внеклеточного домена и спаривают на структурном каркасе, который позволяет каждой переменной области связываться с отдельными антигенами.

Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает применение первого домена C_{H3} иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_{H3} Ig, причем первый и второй домены C_{H3} Ig отличаются от друг друга по меньшей мере одной

аминокислотой, и причем по меньшей мере отличие по одной аминокислоте снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, не имеющим такого отличия по аминокислоте. В одном из варианте осуществления первый домен C_H3 Ig связывается с белком А, а второй домен C_H3 Ig содержит мутацию, которая снижает или отменяет связывание с белком А, такую как модификация H95R (по IMGT нумерации экзонов; H435R по нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые могут присутствовать 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 антител IgG1; N44S, K52N и V82I (по 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. Варианты биспецифического формата антитела, описанного выше, рассматриваются в рамках настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диател, слитых IgG-scFv, двойных переменных доменов (DVD)-Ig, квадромов, структур "выступ-во-впадину", обычных легких цепей (например, общей легкой цепи со структурами "выступ-во-впадину" и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тело, лейциновой застежки-молнии, Duobody, IgG1/IgG2, Fab в формате два-в-одном (DAF)-IgG и Mab (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 и ссылки, цитируемые в этом документе, для обзора вышеупомянутых форматов). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с помощью конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, где используются неприродные аминокислоты с ортогональной химической реактивностью для создания сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самоорганизуются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: 4 декабря 2012 г.]).

Терапевтическое введение и составы.

Изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим анти-NPR1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Терапевтические композиции в соответствии с изобретением могут вводиться с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые включают в составы для улучшения переноса, доставки, толерантности и т.п. Множество подходящих составов можно найти в формуляре, 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 (катионный или анионный), содержащий везикулы (например, LIPOFECTIN™), ДНК конъюгаты, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии Карбовакс (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие Карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA (1998), J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311.

Доза антитела может меняться в зависимости от возраста и размера субъекта, которому предназначено введение, целевого заболевания, условий, пути введения и т.п. Когда антитело по настоящему изобретению используется для лечения заболевания или расстройства у взрослого пациента или для профилактики такого заболевания, предпочтительно вводить антитело по настоящему изобретению обычно в виде одной дозы от примерно 0,1 до примерно 100 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния можно регулировать частоту и продолжительность лечения. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно вводить в виде начальной дозы от по меньшей мере примерно 0,1 до примерно 800 мг, от примерно 1 до примерно 600 мг, от примерно 5 до примерно 500 мг или от примерно 10 до примерно 400 мг. В некоторых вариантах осуществления за начальной дозой может следовать введение второй или нескольких последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть примерно таким же или меньшим, чем количество начальной дозы, при этом последующие дозы разделены по меньшей мере 1-3 днями; по меньшей мере одной неделей, по меньшей мере 2 неделями; по меньшей мере 3 неделями; по меньшей мере 4 неделями; по меньшей мере 5 неделями; по меньшей мере 6 неделями; по меньшей мере 7 неделями; по меньшей мере 8 неделями; по меньшей мере 9 неделями; по меньшей мере 10 неделями; по меньшей мере 12 неделями или по меньшей мере 14 неделями.

Известны различные системы доставки, которые могут использоваться для введения фармацевтической композиции по изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987), J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, без ограничения, внутрикожный, трансдермальный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным способом, например путем инфузии или болюсной инъекции, абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой и кишки и т.д.), а также можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическая композиция также может быть доставлена в

везикуле, в частности в липосомах (см., например, Langer (1990), Science, 249:1527-1533).

В настоящем описании также рассматривается применение наночастиц для доставки антител по настоящему изобретению. Наночастицы, конъюгированные с антителами, могут использоваться как для терапевтических, так и для диагностических целей. Наночастицы, конъюгированные с антителами, и способы их получения и применения подробно описаны Arruebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" в J. Nanomat. Volume 2009, ID статьи 439389, 24 стр., doi: 10.1155/2009/439389), включенной в настоящее описание посредством ссылки. Наночастицы могут быть разработаны и конъюгированы с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для целевых клеток. Наночастицы для доставки лекарственных средств также описаны, например, в US 8257740 или US 8246995, каждая из которых включена в настоящее описание во всей своей полноте.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена 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 система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени, на которую направлена композиция, что требует лишь части системной дозы.

Препараты для инъекций могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутривенных, внутривенных, внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти препараты для инъекций могут быть приготовлены общеизвестными способами.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть введена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению можно использовать ручку для доставки. Такое устройство доставки, как ручка, может быть многоразовым или одноразовым. В ручке в виде многоразового устройства доставки обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После введения всего количества фармацевтической композиции, находящейся в картридже, и опустошения картриджа пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. После этого устройство доставки в виде ручки можно использовать повторно. В ручке в виде одноразового устройства доставки сменный картридж отсутствует. Точнее, ручка в виде одноразового устройства доставки поставляется с предварительно заполненной фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После того как фармацевтическая композиция в резервуаре полностью используется, само устройство выбрасывают.

Преимущественно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения готовят в виде лекарственных форм в единичной дозе, подходящей для установленной дозы активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антитела обычно составляет от примерно 5 до примерно 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; в частности, в случае лекарственной формы для инъекции предпочтительно, чтобы антитело содержалось в количестве от примерно 5 до примерно 300 мг и другие лекарственные формы находились в количестве от примерно 10 до примерно 300 мг.

Терапевтическое применение антител.

Антитела по настоящему изобретению полезны для лечения и/или профилактики заболевания или расстройства, или состояния, ассоциированного с NPR1, и/или для облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким заболеванием, расстройством или состоянием. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно вводить в терапевтической дозе пациенту с заболеванием, расстройством или состоянием, ассоциированным с NPR1.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению полезны для лечения или профилактики по меньшей мере одного симптома или признака NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства, выбранного из группы, состоящей из гипертонии, сердечной недостаточности, ожирения, почечной недостаточности, хронического заболевания почек, отека желтого пятна, глаукомы, инсульта, заболевания легких, фиброза легких, воспаления, астмы, нарушения роста скелета, переломов костей, диабета и рака.

В настоящем описании также предусмотрено применение одного или более антител по настоящему изобретению в профилактических целях субъектами, подверженными риску развития NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению применяют для изготовления фармацевтической композиции или лекарственного средства для лечения пациентов, страдающих заболеванием, расстройством или состоянием, раскрытым в настоящем описании. В другом варианте осуществления изобретения антитела по настоящему изобретению используются в качестве дополнительной терапии с любым другим агентом или любой другой терапией, известной специалистам в данной области и полезной для лечения или облегчения заболевания, расстройства или состояния, раскрытого в настоящем описании.

Комбинированная терапия.

Комбинированная терапия может включать антитело по изобретению и любое дополнительное терапевтическое средство, которое можно эффективно комбинировать с антителом по изобретению или с биологически активным фрагментом антитела по изобретению. Антитела по настоящему изобретению можно синергетически комбинировать с одним или более лекарственными средствами или видами терапии, используемыми для лечения NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению можно комбинировать со вторым терапевтическим агентом для облегчения одного или более симптомов указанного заболевания или состояния.

В зависимости от заболевания, расстройства или состояния антитела по настоящему изобретению можно применять в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, включая, без ограничения, антагонист альдостерона (например, эплеренон, спиронолактон), альфа-адреноблокатор (например, доксазозин, феноксифензамин, фентоламин, празозин, теразозин), ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (ACE) (например, беназеприл, каптоприл, эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, мозексиприл, периндоприл, винаприл, рамиприл, трапринодоприл), артериолярный вазодилататор (например, гидралазин, миноксидил), вегетативный ганглионарный вазодилататор (например, мекамиламин), бета-адреноблокатор (ацебутолол, атенолол, бетаксолол, бисопролол, карведилол, картеолол, эсмолол, лабетолол, метапролол, надолол, пенбутирол, пиндолол, пропранолол, тимолол), симпатолитик, истощающий запасы катехоламина (например, дезерпидин, резерпин), центральный агонист альфа-2-адренорецепторов (например, клонидин, гуанабенз, гуанфацин, метилдопа), блокатор кальциевых каналов (дилтиазем, верапамил, амлодипин, фелодипин, исрадипин, никадипин, нифедипин, нисолдипин), диуретик (например, буметанид, этакриновая кислота, фуросемид, торсемид, хлортиазид, гидрохлортиазид, гидрофлумтиазид, метиклотиазид, политиазид, хлорталидон, индапамид, метолазон), ингибитор ренина (например, алискирен), антикоагулянт (например, кумардин, дабигатран, аписабан), антитромбоцитарный агент (например, аспирин, клопидогрель), агент, снижающий уровень холестерина (например, статин, PCSK9 ингибитор, такой как алирокумаб), вазодилатор (например, миноксидил, гидралазин, нитраты), дигиталис, хирургия (например, ангиопластика, коронарное шунтирование, трансплантация сердца), имплантируемое устройство (например, замена клапана, дефибриллятор, вспомогательное устройство левого желудочка, кардиостимулятор), противоопухолевую терапию (например, химиотерапевтическое средство, хирургическое вмешательство, облучение, ингибитор PD-1), инсулин, агонист GLP1 (например, эксенатид, лираглутид, ликсисенатид, альбиглутид, дулаглутид, семаглутид), метформин, диализ, стимулятор костного мозга, гемофильтрация, изменение образа жизни и пищевая добавка.

Используемый в настоящем описании термин "в комбинации с" означает, что дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить до, одновременно или после введения анти-NPR1 антитела по настоящему изобретению. Термин "в комбинации с" также включает последовательное или одновременное введение анти-NPR1 антитела и второго терапевтического агента.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту до введения анти-NPR1 антитела по настоящему изобретению. Например, первый компонент можно считать введенным "до" второго компонента, если первый компонент введен за 1 неделю, 72, 60, 48, 36, 24, 12, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ч, 30 мин или менее чем 30 мин до введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту после введения анти-NPR1 антитела по настоящему изобретению. Например, первый компонент можно считать введенным "после" второго компонента, если первый компонент введен через 30 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ч или более после введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно с введением анти-NPR1 антитела по настоящему изобретению. "Параллельное" введение для целей настоящего изобретения включает, например, введение анти-NPR1 антитела и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в одной лекарственной форме или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту в пределах примерно 30 мин или менее. При введении в отдельных лекарственных формах каждую лекарственную форму можно вводить одним и тем же путем (например, как анти-NPR1 антитело, так и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно и т.д.); альтернативно, каждую лекарственную форму можно вводить разными путями (например, анти-NPR1 антитело можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить перорально). В любом случае "одновременным введением" для целей настоящего изобретения считается введение компонентов в одной лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах одним и тем же путем или в отдельных лекарственных формах разными путями. Для целей настоящего изобретения введение анти-NPR1 антитела "до", "одновременно с" или "после" (согласно определению этих терминов, представленному выше в настоящем описании) введения дополнительного терапевтически активного компонента следует рассматривать как введение анти-NPR1 антитела "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых анти-NPR1 антитело по настоящему изобретению приготовлено в одном составе с одним или более дополнительными тера-

пептически активными компонентами, как описано в другом месте в настоящем документе.

Диагностическое применение антител.

Антитела по настоящему изобретению можно использовать для обнаружения и/или измерения NPR1 в образце, например, в диагностических целях. Некоторые варианты осуществления предусматривают применение одного или более антител по настоящему изобретению в анализах для обнаружения NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства. Иллюстративные диагностические анализы на NPR1 могут включать, например, контактирование образца, полученного от пациента, с анти-NPR1 антителом по изобретению, где анти-NPR1 антитело метят детектируемой меткой или репортерной молекулой или используют в качестве захватывающего лиганда для селективного выделения NPR1 из образцов пациентов. В качестве альтернативы в диагностических целях немеченое анти-NPR1 антитело можно использовать в комбинации со вторичным антителом, которое само по себе является детектируемой меткой. Детектируемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилуминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения NPR1 в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACS).

Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах на NPR1 по настоящему изобретению, включают любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит детектируемые количества белка NPR1 или его фрагментов в нормальном или патологическом состоянии. Как правило, для первоначального определения исходного или стандартного уровня NPR1 измеряют уровни белка NPR1 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего NPR1-ассоциированным заболеванием). Затем этот исходный уровень NPR1 можно сравнить с уровнями NPR1, измеренными в образцах, полученных от лиц с подозрением на наличие NPR1-ассоциированного состояния или симптомов, связанных с таким состоянием.

Антитела, специфичные к белку NPR1, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов, или могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном из вариантов осуществления метка или фрагмент представляют собой биотин. В анализе связывания расположение метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, на которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевой участок пептида будет располагаться дистальнее поверхности.

Примеры

Приведенные ниже примеры приведены с целью предоставления специалистам в данной области техники полного раскрытия и описания того, как разработать и применить способы и композиции по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Несмотря на то, что были предприняты все усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), следует учитывать наличие некоторых экспериментальных ошибок и отклонений. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура дана в градусах Цельсия, комнатная температура составляет примерно 25°C и давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Создание человеческих антител к рецептору натрийуретического пептида 1 (NPR1).

Человеческие антитела к белку NPR1 получали у мышей VELOCIMMUNE®, содержащих ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и каппа-легкой цепи иммуноглобулина человека. Мышей иммунизировали ДНК человеческого NPR1 и мышиноного ANP путем гидродинамической доставки ДНК и стимулировали внеклеточным доменом человеческого белка NPR1 в комплексе с мышинным ANP.

Иммунный ответ антител контролировали с помощью NPR1-специфического иммуноанализа. При достижении требуемого иммунного ответа спленоциты собирали и выполняли слияние с клетками мышиной миеломы для сохранения их жизнеспособности и образования гибридных клеточных линий. Гибридные клеточные линии подвергли скринингу и отбирали для идентификации клеточные линии, которые продуцируют NPR1-специфические антитела. Клеточные линии использовали для получения нескольких химерных анти-NPR1 антител (т.е. антител, содержащих человеческие переменные домены и мышинные константные домены).

Анти-NPR1 антитела также выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток мыши без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США 7582298, который специально включен в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. Используя этот метод, получали несколько полностью человеческих анти-NPR1 антител (т.е. антител, имеющих человеческие переменные домены и человеческие константные домены).

Иллюстративные антитела, полученные описанным выше способом, обозначали как mAb22033, mAb22035, mAb22805, mAb22809, mAb22810, mAb25479, mAb25491, mAb25497, mAb25498, mAb25502, mAb25508 и mAb25545.

Биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

Пример 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранных анти-NPR1 антител по изобретению.

Таблица 1

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCD R3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR 3
mAb22033	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb22035	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb22805	34	36	38	40	42	44	46	48
mAb22809	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb22810	66	68	70	72	74	76	78	80
mAb25479	82	84	86	88	90	92	94	96
mAb25491	98	100	102	104	106	108	110	112
mAb25497	114	116	118	120	122	124	126	128
mAb25498	130	132	134	136	138	140	142	144
mAb25502	146	148	150	152	154	156	158	160
mAb25508	162	164	166	168	170	172	174	176
mAb25545	178	180	182	184	186	188	190	192

Идентификаторы соответствующих последовательностей нуклеиновых кислот представлены в табл. 2.

Таблица 2

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCD R1	LCD R2	LCD R3
mAb22033	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb22035	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb22805	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb22809	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb22810	65	67	69	71	73	75	77	79
mAb25479	81	83	85	87	89	91	93	95
mAb25491	97	99	101	103	105	107	109	111
mAb25497	113	115	117	119	121	123	125	127
mAb25498	129	131	133	135	137	139	141	143
mAb25502	145	147	149	151	153	155	157	159
mAb25508	161	163	165	167	169	171	173	175
mAb25545	177	179	181	183	185	187	189	191

Представленные в настоящем описании антитела обычно имеют полностью человеческие переменные области, но могут иметь константные области человека или мыши. Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, имеющее конкретный изотип Fc-домена, может быть преобразовано в антитело с другим изотипом Fc-домена (например, антитело с Fc-доменом мышинного IgG1 может быть преобразовано в антитело с человеческим IgG4 и т.д.), но в любом случае переменные домены (включая CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в табл. 2, остаются такими же, и ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или по существу идентичными независимо от природы Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления выбранные антитела с Fc-доменом мышинного IgG1 преобразуют в антитела с Fc-доменом человеческого IgG4. В одном из вариантов осуществления Fc-домен IgG4 содержит две или более аминокислотные замены, как описано в US 2010/0331527. В одном из вариантов осуществления Fc-домен человеческого IgG4 содержит мутацию

серина в пролин в шарнирной области (S108P), что способствует стабилизации димера. Если не указано иное, все антитела, используемые в приведенных ниже примерах, содержат изотип человеческого IgG4.

Контрольные конструкции, используемые в примерах ниже.

Для целей сравнения в приведенные в настоящее описание эксперименты включена следующая контрольная конструкция (анти-NPR1 антитела): "Компаратор 1", моноклональное антитело к человеческому NPR1, имеющее последовательности V_H/V_L антитела "mAb5591" согласно патенту США № 2012/0114659 (Morphosys).

Пример 3. Связывание антител с NPR1, определенное методом поверхностного плазмонного резонанса.

Процедура проведения эксперимента.

Константу равновесной диссоциации (K_D) для различных реагентов NPR1, которые связываются с очищенными моноклональными анти-NPR1 антителами (mAb), определяли с помощью биосенсора Biacore 4000 методом поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени. Все эксперименты по связыванию проводили в рабочем буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Твин-20, pH 7,4 (HBS-ET) при 25 и 37°C. Поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 сначала дериватизировали путем иммобилизации по аминокгруппе либо мышинных антител к человеческому Fc (GE Healthcare, # BR100839), либо козьих поликлональных антител к человеческому Fc γ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, # BR-1008-39) для захвата анти-NPR1 mAb. Эксперименты по связыванию выполняли, используя внеклеточный домен человеческого NPR1, экспрессируемый с С-концевым мус-мус-гексагистидином (hNPR1-ММН) (SEQ ID NO: 194), внеклеточный домен NPR1 обезьяны, экспрессируемый с С-концевым мус-мус-гексагистидином (mfNPR1-ММН) (SEQ ID NO: 195), внеклеточный домен NPR1 мыши, экспрессируемый с С-концевым мус-мус-гексагистидином (mNPR1-ММН) (SEQ ID NO: 196), внеклеточный домен NPR1 человека, экспрессируемый с С-концевым IgG2a мыши (hNPR1-mFc) (SEQ ID NO: 197), внеклеточный домен NPR1 обезьяны, экспрессируемый с С-концевым IgG2a мыши (mfNPR1-mFc) (SEQ ID NO: 198), внеклеточный домен NPR1 мыши, экспрессируемый с С-концевым IgG2a мыши (mNPR1-mFc) (SEQ ID NO: 199), hNPR1-mFc+hANP, hNPR1-mFc+hBNP, mfNPR1-mFc+hANP, mfNPR1-mFc+hBNP, mNPR1-mFc+mANP, mNPR1-mFc+mBNP. Разные концентрации hNPR1-ММН, mfNPR1-ММН (100-3,7 нМ, 3-кратное серийное разведение; или 100-6,25 нМ, 4-кратное серийное разведение); hNPR1-mFc, mfNPR1.mFc (100-1,56 нМ, 4-кратное серийное разведение; или 100-3,7 нМ, 3-кратное серийное разведение); mNPR1.mmh (100 нМ), hNPR1-mFc или mfNPR1-mFc в комплексе с hANP или hBNP с 10-кратной концентрацией (100, 25, 6,25 или 100-3,7 нМ, 3-кратное серийное разведение); mNPR1.mFc в комплексе с mANP или mBNP с 10-кратной концентрацией (100, 25 или 100-3,7 нМ, 3-кратное серийное разведение) или hNPR1-hFc или hNPR1-hFc в комплексе с hANP с 10-кратной концентрацией (100-6,25 нМ, 4-кратное серийное разведение), приготовленные в рабочем буфере HBS-ET, вводили в течение 4 мин при скорости потока 30 мкл/мин, при этом диссоциацию mAb, связанного с различными реагентами NPR1, контролировали в течение 10 мин в рабочем буфере HBS-ET. В конце каждого цикла поверхность захвата NPR1 mAb регенерировали, используя либо 10-секундную инъекцию 20 мМ фосфорной кислоты для мышинных анти-человеческих Fc-специфичных mAb, либо 40-секундную инъекцию 10 мМ глицина, HCl, pH 1,5, для козьих анти-человеческих Fc-специфичных поликлональных антител, либо две инъекции 10 мМ Gly, pH 1,5, в течение 1 мин. Скорость ассоциации (k_a) и скорость диссоциации (k_d) определяли путем подгонки сенсограмм связывания в реальном времени к модели связывания 1:1 с ограничением массопереноса с помощью программного обеспечения для построения кривой Scrubber 2.0с. Равновесную константу диссоциации для связывания (K_D) и период полураспада за счет диссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали из кинетических скоростей следующим образом:

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

Полученные результаты.

Параметры кинетики связывания для различных белков NPR1, которые связываются с выбранными анти-NPR1 антителами по изобретению при 25 и 37°C, показаны в табл. 3-26.

Таблица 3

Параметры кинетики связывания для связывания hNPR1-ММН с анти-NPR1 моноклональными антителами при 25°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	377 ± 0,9	30	8,55E+03	4,06E-04	4,75E-08	28,4
mAb22035	368 ± 0,6	210	2,03E+05	1,50E-04	7,38E-10	77,3
mAb22805	356 ± 0,7	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22809	359 ± 1,1	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	386 ± 3,8	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25479	338 ± 1,2	16	1,40E+04	6,73E-03	4,82E-07	1,7
mAb25491	275 ± 0,9	37	2,62E+04	9,83E-04	3,76E-08	11,7
mAb25497	314 ± 0,6	22	3,17E+04	1,67E-03	5,27E-08	6,9
mAb25498	325 ± 0,8	68	2,25E+04	1,82E-03	8,10E-08	6,3
mAb25502	349 ± 2,3	2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25508	296 ± 1	192	4,32E+05	1,34E-04	3,09E-10	86,5
mAb25545	360 ± 0,7	2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
IgG4 изотипический контроль	315 ± 0,7	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Таблица 4

Параметры кинетики связывания для связывания hNPR1-ММН с анти-NPR1 моноклональными антителами при 37°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	473 ± 2,1	52	6,03E+03	8,19E-04	1,36E-07	14,1
mAb22035	492 ± 2,3	284	2,40E+05	3,12E-04	1,30E-09	37,1
mAb22805	451 ± 2	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22809	466 ± 2	-1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	428 ± 1,2	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25479	443 ± 4,5	16	2,28E+04	1,57E-02	6,89E-07	0,7
mAb25491	357 ± 1,8	51	3,56E+04	4,53E-03	1,27E-07	2,5
mAb25497	402 ± 3	31	1,86E+04	2,58E-03	1,39E-07	4,5
mAb25498	418 ± 2,8	97	2,25E+04	4,15E-03	1,84E-07	2,8
mAb25502	452 ± 3,3	4	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25508	397 ± 2,1	252	4,53E+05	2,22E-04	4,90E-10	52,1
mAb25545	463 ± 1,7	7	IC*	IC*	IC*	IC*
IgG4 изотипический контроль	417 ± 3,1	3	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Таблица 5

Параметры кинетики связывания для связывания mfNPR1-ММН с анти-NPR1 моноклональными антителами при 25°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	376 ± 0,8	79	1,79E+04	2,91E-04	1,62E-08	39,6
mAb22035	368 ± 0,8	245	4,26E+05	1,43E-04	3,36E-10	80,8
mAb22805	356 ± 1,1	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22809	359 ± 0,9	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	381 ± 0,8	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25479	338 ± 0,5	41	2,77E+04	6,82E-03	2,46E-07	1,7
mAb25491	275 ± 0,4	81	4,20E+04	1,28E-03	3,05E-08	9,0
mAb25497	315 ± 0,6	49	3,78E+04	2,26E-03	5,98E-08	5,1
mAb25498	327 ± 0,5	114	5,79E+04	1,58E-03	2,72E-08	7,3
mAb25502	350 ± 0,9	3	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25508	298 ± 1,1	213	7,06E+05	1,32E-04	1,87E-10	87,5
mAb25545	360 ± 0,5	4	IC*	IC*	IC*	IC*
IgG4 изотипический контроль	315 ± 0,6	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Таблица 6

Параметры кинетики связывания для связывания mfNPR1-ММН с анти-NPR1 моноклональными антителами при 37°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	470 ± 1,4	131	2,51E+04	6,97E-04	2,78E-08	16,6
mAb22035	490 ± 1,3	319	5,32E+05	3,74E-04	7,02E-10	30,9
mAb22805	449 ± 1,3	3	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22809	465 ± 1	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	426 ± 1,1	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25479	440 ± 1,8	43	3,96E+04	1,42E-02	3,60E-07	0,8
mAb25491	353 ± 1,2	106	5,83E+04	4,57E-03	7,84E-08	2,5
mAb25497	397 ± 1,4	69	2,77E+04	3,84E-03	1,39E-07	3,0
mAb25498	414 ± 1,7	151	7,07E+04	3,69E-03	5,21E-08	3,1
mAb25502	449 ± 1,7	6	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25508	394 ± 1,1	275	7,82E+05	2,73E-04	3,49E-10	42,3
mAb25545	461 ± 1	10	IC*	IC*	IC*	IC*
IgG4 изотипический контроль	413 ± 1,3	3	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Таблица 7

Параметры кинетики связывания для связывания mNPR1-ММН с анти-NPR1 моноклональными антителами при 25°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	376 ± 0,7	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22035	368 ± 0,2	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22805	358 ± 1,9	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22809	358 ± 0,3	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	378 ± 0,3	-1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25479	338 ± 1,2	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25491	276 ± 0,3	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25497	315 ± 0,1	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25498	326 ± 0,6	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25502	349 ± 0,7	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25508	296 ± 1,2	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25545	359 ± 0,1	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
IgG4 изотипический контроль	315 ± 0,1	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 8

Параметры кинетики связывания для связывания mNPR1-ММН с анти-NPR1 моноклональными антителами при 37°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	468 ± 0,6	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22035	491 ± 0,9	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22805	450 ± 0,2	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22809	466 ± 0,1	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	420 ± 0,1	-2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25479	438 ± 0,2	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25491	353 ± 1,8	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25497	395 ± 0,7	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25498	413 ± 0,2	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25502	447 ± 0,9	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25508	392 ± 0,3	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25545	460 ± 0,4	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
IgG4 изотипический контроль	412 ± 0,4	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 9

Параметры кинетики связывания для связывания hNPR1-mFc или hNPR1-hFc с анти-NPR1 моноклональными антителами при 25°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанног о Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	351 ± 1,3	56	6,18E+04	6,38E-05	1,03E-09	181,0
mAb22035	347 ± 1,2	198	2,25E+05	8,20E-05	3,65E-10	140,9
mAb22805	331 ± 0,8	2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22809	327 ± 0,7	-2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	380 ± 0,4	4	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb25479	327 ± 2,1	26	3,80E+04	8,52E-04	2,24E-08	13,6
mAb25491	249 ± 2,8	36	1,01E+05	1,24E-04	1,24E-09	92,8
mAb25497	302 ± 25,8	49	2,03E+05	4,83E-05	2,38E-10	239,3
mAb25498	312 ± 0,8	94	6,98E+04	2,55E-04	3,65E-09	45,3
mAb25502	321 ± 1,6	17	8,79E+04	8,74E-05	9,94E-10	132,1
mAb25508	276 ± 1,5	211	7,89E+05	6,85E-05	8,68E-11	168,6
mAb25545	340 ± 1,1	7	IC*	IC*	IC*	IC*
IgG4 изотипически й контроль	298 ± 1,6	-14	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Таблица 10

Параметры кинетики связывания для связывания hNPR1-mFc или hNPR1-hFc с анти-NPR1 моноклональными антителами при 37°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанног о Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	423 ± 3,1	75	3,68E+04	1,31E-04	3,56E-09	88,2
mAb22035	454 ± 3,6	257	6,36E+05	1,27E-04	2,00E-10	90,8
mAb22805	406 ± 1,8	8	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22809	413 ± 1,6	-1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	423 ± 0,8	9	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb25479	414 ± 5,6	47	3,37E+04	1,39E-03	4,12E-08	8,3
mAb25491	298 ± 1,6	70	4,19E+04	3,63E-04	8,66E-09	31,8
mAb25497	344 ± 1,7	43	4,23E+04	3,10E-04	7,31E-09	37,3
mAb25498	381 ± 2	129	8,86E+04	5,68E-04	6,41E-09	20,3
mAb25502	396 ± 2,8	9	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25508	353 ± 1,3	242	8,38E+05	1,01E-04	1,21E-10	113,9
mAb25545	415 ± 2,8	15	IC*	IC*	IC*	IC*
IgG4 изотипически й контроль	366 ± 3,9	-19	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Таблица 11

Параметры кинетики связывания для связывания комплекса hNPR1-mFc:hANP или hNPR1-hFc:hANP с анти-NPR1 моноклональными антителами при 25°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	350 ± 0,4	84	6,03E+04	8,60E-05	1,43E-09	134,4
mAb22035	347 ± 0,3	186	1,79E+05	7,78E-05	4,34E-10	148,4
mAb22805	331 ± 1,8	84	4,31E+04	1,41E-04	3,28E-09	81,7
mAb22809	327 ± 1,5	53	3,92E+04	1,93E-04	4,94E-09	59,7
mAb22810	378 ± 0,6	14	8,31E+03	3,44E-04	4,14E-08	34
mAb25479	327 ± 2,4	49	3,10E+04	1,09E-04	3,53E-09	105,8
mAb25491	250 ± 1,7	71	5,22E+04	4,15E-05	7,94E-10	278,5
mAb25497	292 ± 2,1	59	1,63E+05	4,56E-05	2,79E-10	253,1
mAb25498	313 ± 0,6	52	4,58E+04	3,17E-04	6,93E-09	36,4
mAb25502	321 ± 4,3	81	6,06E+04	2,53E-04	4,17E-09	45,7
mAb25508	278 ± 4,2	199	2,64E+05	8,97E-05	3,40E-10	128,8
mAb25545	341 ± 1,8	28	2,34E+04	4,63E-05	1,98E-09	249,7
IgG4 изотипический контроль	297 ± 1,5	-12	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

§ Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Таблица 12

Параметры кинетики связывания для связывания комплекса hNPR1-mFc:hANP или hNPR1-hFc:hANP с анти-NPR1 моноклональными антителами при 37°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	412 ± 1,2	108	5,79E+04	9,80E-05	1,69E-09	117,9
mAb22035	444 ± 2	237	2,25E+05	1,14E-04	5,08E-10	101,0
mAb22805	399 ± 1,9	113	6,01E+04	2,95E-04	4,91E-09	39,2
mAb22809	406 ± 0,8	68	5,04E+04	1,66E-04	3,29E-09	69,5
mAb22810	421 ± 0,8	26	1,37E+04	1,04E-03	7,55E-08	11
mAb25479	408 ± 7,6	84	4,97E+04	1,34E-04	2,70E-09	86,1
mAb25491	291 ± 1,3	96	5,69E+04	1,11E-04	1,95E-09	104,1
mAb25497	336 ± 1,6	60	4,85E+04	1,02E-04	2,09E-09	113,7
mAb25498	375 ± 1,9	74	5,30E+04	7,20E-04	1,36E-08	16,0
mAb25502	388 ± 5,1	105	7,20E+04	4,67E-04	6,49E-09	24,7
mAb25508	348 ± 0,8	230	2,93E+05	1,48E-04	5,06E-10	77,9
mAb25545	409 ± 2,7	58	3,67E+04	8,61E-05	2,35E-09	134,2
IgG4 изотипический контроль	358 ± 4,9	-18	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

§ Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Таблица 13

Параметры кинетики связывания для связывания комплекса hNPR1-mFc:hBNP с анти-NPR1 моноклональными антителами при 25°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанног о Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	350 ± 0,4	85	5,43E+04	6,67E-05	1,23E-09	173,2
mAb22035	348 ± 2,9	194	1,71E+05	8,70E-05	5,08E-10	132,7
mAb22805	330 ± 0,4	84	4,14E+04	1,52E-04	3,68E-09	75,8
mAb22809	327 ± 0,4	51	3,28E+04	2,21E-04	6,72E-09	52,4
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	326 ± 0,5	50	2,92E+04	1,23E-04	4,21E-09	94,1
mAb25491	250 ± 0,3	72	5,46E+04	4,96E-05	9,08E-10	232,9
mAb25497	292 ± 0,4	59	1,53E+05	5,49E-05	3,58E-10	210,5
mAb25498	313 ± 0,4	55	4,85E+04	2,56E-04	5,28E-09	45,1
mAb25502	317 ± 1,5	78	6,94E+04	2,36E-04	3,40E-09	49,0
mAb25508	275 ± 0,6	200	2,50E+05	8,57E-05	3,43E-10	134,7
mAb25545	340 ± 0,2	27	2,30E+04	6,26E-05	2,72E-09	184,6
IgG4 изотипически й контроль	296 ± 0,5	-11	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 14

Параметры кинетики связывания для связывания комплекса hNPR1-mFc:hBNP с анти-NPR1 моноклональными антителами при 37°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанног о Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	409 ± 1,4	108	5,37E+04	9,60E-05	1,79E-09	120,3
mAb22035	440 ± 0,8	243	2,32E+05	1,28E-04	5,53E-10	90,0
mAb22805	398 ± 1,4	112	5,20E+04	3,13E-04	6,02E-09	36,9
mAb22809	405 ± 0,5	63	4,65E+04	1,66E-04	3,56E-09	69,8
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	402 ± 0,4	85	4,27E+04	1,63E-04	3,83E-09	70,7
mAb25491	289 ± 1,5	96	5,47E+04	1,34E-04	2,45E-09	86,2
mAb25497	333 ± 1,1	59	4,92E+04	1,16E-04	2,35E-09	99,7
mAb25498	372 ± 0,9	76	5,29E+04	9,48E-04	1,79E-08	12,2
mAb25502	391 ± 0,7	102	6,03E+04	4,72E-04	7,82E-09	24,5
mAb25508	347 ± 0,9	236	3,52E+05	1,64E-04	4,66E-10	70,3
mAb25545	405 ± 1,2	56	3,46E+04	9,84E-05	2,85E-09	117,3
IgG4 изотипически й контроль	354 ± 0,4	-17	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 15

Параметры кинетики связывания для связывания mfNPR1-mFc с анти-NPR1 моноклональными антителами при 25°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанног о Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	351 ± 0,7	96	5,17E+04	4,85E-05	9,38E-10	238,0
mAb22035	346 ± 0,6	231	2,44E+05	5,57E-05	2,29E-10	207,2
mAb22805	331 ± 1,6	10	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb22809	328 ± 0,7	6	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	325 ± 0,7	54	3,12E+04	5,07E-04	1,62E-08	22,8
mAb25491	251 ± 1,4	81	5,40E+04	7,54E-05	1,40E-09	153,1
mAb25497	292 ± 1	76	1,72E+05	5,79E-05	3,37E-10	199,4
mAb25498	313 ± 0,6	128	7,20E+04	1,77E-04	2,45E-09	65,4
mAb25502	321 ± 1,9	22	8,83E+04	1,41E-04	1,60E-09	82,0
mAb25508	276 ± 0,9	230	5,15E+05	5,98E-05	1,16E-10	193,3
mAb25545	340 ± 0,7	13	IC*	IC*	IC*	IC*
IgG4 изотипический контроль	297 ± 0,6	5	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 16

Параметры кинетики связывания для связывания mfNPR1-mFc с анти-NPR1 моноклональными антителами при 37°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанног о Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	415 ± 1,3	126	4,82E+04	9,90E-05	2,06E-09	116,7
mAb22035	447 ± 1,5	291	4,59E+05	8,44E-05	1,84E-10	136,9
mAb22805	402 ± 1,7	16	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb22809	409 ± 1,6	8	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	408 ± 1,3	89	3,82E+04	1,08E-03	2,81E-08	10,7
mAb25491	294 ± 1,6	114	4,70E+04	1,64E-04	3,49E-09	70,4
mAb25497	340 ± 1,1	79	4,25E+04	2,21E-04	5,20E-09	52,3
mAb25498	377 ± 1,4	170	9,16E+04	3,72E-04	4,06E-09	31,1
mAb25502	393 ± 1,7	17	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb25508	350 ± 1,1	268	6,34E+05	8,36E-05	1,32E-10	138,2
mAb25545	410 ± 1	26	5,51E+04	1,44E-04	2,62E-09	80,0
IgG4 изотипический контроль	360 ± 1,4	8	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 17

Параметры кинетики связывания для связывания комплекса
mfNPR1-mFc:hANP с анти-NPR1 моноклональными антителами при 25°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	349 ± 0,5	133	6,58E+04	5,36E-05	8,15E-10	215,5
mAb22035	346 ± 0,7	227	1,89E+05	4,66E-05	2,46E-10	247,9
mAb22805	330 ± 0,5	116	4,84E+04	9,51E-05	1,96E-09	121,4
mAb22809	327 ± 0,5	86	4,47E+04	1,73E-04	3,88E-09	66,6
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	326 ± 0,3	86	4,20E+04	1,03E-04	2,44E-09	112,7
mAb25491	250 ± 0,8	111	6,01E+04	4,55E-05	7,57E-10	253,8
mAb25497	292 ± 0,6	95	1,56E+05	3,75E-05	2,40E-10	307,7
mAb25498	313 ± 0,4	81	4,19E+04	1,12E-04	2,68E-09	102,9
mAb25502	316 ± 2,7	113	7,40E+04	2,64E-04	3,56E-09	43,8
mAb25508	273 ± 0,5	224	3,14E+05	7,32E-05	2,33E-10	157,7
mAb25545	339 ± 0,4	45	2,28E+04	5,37E-05	2,35E-09	215,1
IgG4 изотипически й контроль	296 ± 0,5	7	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

§ Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 18

Параметры кинетики связывания для связывания комплекса
mfNPR1-mFc:hANP с анти-NPR1 моноклональными антителами при 37°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	407 ± 1,1	169	6,80E+04	8,90E-05	1,31E-09	129,8
mAb22035	438 ± 0,6	283	2,55E+05	7,70E-05	3,02E-10	150,1
mAb22805	395 ± 0,3	153	6,33E+04	2,09E-04	3,30E-09	55,3
mAb22809	403 ± 0,4	106	5,55E+04	2,05E-04	3,70E-09	56,2
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	401 ± 1,6	138	5,47E+04	2,19E-04	4,00E-09	52,8
mAb25491	288 ± 1	148	7,10E+04	1,06E-04	1,49E-09	109,0
mAb25497	332 ± 0,6	102	5,84E+04	1,52E-04	2,60E-09	75,9
mAb25498	370 ± 1,5	114	5,01E+04	4,45E-04	8,89E-09	25,9
mAb25502	390 ± 0,7	143	9,10E+04	5,24E-04	5,76E-09	22,0
mAb25508	346 ± 0,3	262	4,11E+05	1,46E-04	3,55E-10	79,3
mAb25545	404 ± 1,2	86	4,01E+04	8,18E-05	2,04E-09	141,2
IgG4 изотипически й контроль	353 ± 0,8	9	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

§ Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 19

Параметры кинетики связывания для связывания комплекса
mfNPR1-mFc:hBNP с анти-NPR1 моноклональными антителами при 25°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	349 ± 0,7	132	6,59E+04	5,15E-05	7,81E-10	224,2
mAb22035	346 ± 0,3	231	2,05E+05	6,13E-05	3,00E-10	188,3
mAb22805	330 ± 1,5	113	4,53E+04	9,60E-05	2,12E-09	120,4
mAb22809	327 ± 0,6	80	4,14E+04	1,60E-04	3,85E-09	72,4
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	325 ± 0,1	86	3,81E+04	1,13E-04	2,95E-09	102,6
mAb25491	249 ± 0,7	110	5,86E+04	3,71E-05	6,32E-10	311,7
mAb25497	291 ± 0,1	93	1,40E+05	4,47E-05	3,20E-10	258,4
mAb25498	312 ± 0,6	81	4,32E+04	1,09E-04	2,53E-09	106,0
mAb25502	314 ± 3,4	110	6,90E+04	2,82E-04	4,08E-09	41,0
mAb25508	273 ± 0,8	229	3,08E+05	8,91E-05	2,90E-10	129,6
mAb25545	339 ± 0,1	42	2,39E+04	4,97E-05	2,08E-09	232,5
IgG4 изотипический контроль	296 ± 1,1	7	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны;

Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 20

Параметры кинетики связывания для связывания комплекса
mfNPR1-mFc:hBNP с анти-NPR1 моноклональными антителами при 37°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	406 ± 1,4	167	6,75E+04	8,80E-05	1,30E-09	131,3
mAb22035	436 ± 1,1	286	2,58E+05	9,48E-05	3,68E-10	121,9
mAb22805	394 ± 1	150	5,96E+04	2,02E-04	3,39E-09	57,2
mAb22809	402 ± 0,9	99	5,34E+04	2,29E-04	4,29E-09	50,5
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	399 ± 0,7	135	5,30E+04	2,93E-04	5,53E-09	39,4
mAb25491	286 ± 0,7	146	6,89E+04	1,10E-04	1,60E-09	105,0
mAb25497	330 ± 0,5	100	5,74E+04	1,66E-04	2,90E-09	69,5
mAb25498	369 ± 0	113	5,21E+04	4,64E-04	8,91E-09	24,9
mAb25502	388 ± 1,5	139	8,52E+04	4,81E-04	5,65E-09	24,0
mAb25508	344 ± 0,3	266	4,23E+05	1,50E-04	3,54E-10	77,1
mAb25545	402 ± 0,7	82	3,71E+04	7,77E-05	2,09E-09	148,6
IgG4 изотипический контроль	351 ± 0,5	9	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 21

Параметры кинетики связывания для связывания mNPR1-mFc
с анти-NPR1 моноклональными антителами при 25°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	350 ± 0,5	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22035	346 ± 0,8	-1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22805	330 ± 0,5	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22809	328 ± 0,7	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	325 ± 0,3	-1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25491	250 ± 1,1	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25497	292 ± 0,7	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25498	313 ± 1	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25502	321 ± 1,1	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25508	275 ± 0,7	-1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25545	340 ± 0,2	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
IgG4	296 ± 0,6	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
изотипический контроль						

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 22

Параметры кинетики связывания для связывания mNPR1-mFc
с анти-NPR1 моноклональными антителами при 37°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	413 ± 0,4	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22035	444 ± 0,5	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22805	400 ± 0,2	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22809	407 ± 1	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	406 ± 0,3	2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25491	291 ± 0,9	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25497	336 ± 0,7	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25498	375 ± 1	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25502	391 ± 0,6	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25508	347 ± 0,4	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25545	407 ± 0,7	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
IgG4 изотипический контроль	359 ± 0,6	2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 23

Параметры кинетики связывания для связывания комплекса
mNPR1-mFc:hANP с анти-NPR1 моноклональными антителами при 25°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанног о Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	348 ± 0,4	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22035	345 ± 0,4	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22805	330 ± 1,1	18	1,98E+05	8,39E-02	4,24E-07	0,14
mAb22809	326 ± 0,4	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	324 ± 0,8	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25491	249 ± 0,9	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25497	290 ± 0,5	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25498	311 ± 0,9	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25502	317 ± 2,4	25	2,37E+05	7,99E-02	3,37E-07	0,14
mAb25508	274 ± 0,8	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25545	339 ± 0,3	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
IgG4 изотипически й контроль	295 ± 0,8	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

[#] Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 24

Параметры кинетики связывания для связывания комплекса
mNPR1-mFc:hANP с анти-NPR1 моноклональными антителами при 37°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	402 ± 1,8	2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22035	435 ± 0,8	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22805	392 ± 1	15	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb22809	400 ± 0,7	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	397 ± 1,2	2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25491	284 ± 0,7	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25497	328 ± 0,8	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25498	367 ± 0,4	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25502	386 ± 2,1	35	2,64E+05	8,83E-02	3,34E-07	0,13
mAb25508	343 ± 1,1	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25545	401 ± 0,8	3	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
IgG4 изотипический контроль	349 ± 0,5	2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

[#] Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 25

Параметры кинетики связывания для связывания комплекса
mNPR1-mFc:hBNP с анти-NPR1 моноклональными антителами при 25°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанног о Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	347 ± 1,1	5	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22035	345 ± 0,8	0	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22805	329 ± 0,9	21	1,53E+05	6,82E-02	4,45E-07	0,17
mAb22809	326 ± 1,1	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	325 ± 0,2	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25491	249 ± 0,4	5	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25497	291 ± 0,2	2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25498	312 ± 0,8	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25502	318 ± 0,3	25	2,34E+05	5,03E-02	2,15E-07	0,23
mAb25508	274 ± 0,6	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25545	339 ± 0,4	3	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
IgG4 изотипический контроль	296 ± 0,6	2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

[#] Означает, что условия не были протестированы.

Таблица 26

Параметры кинетики связывания для связывания комплекса
mNPR1-mFc:hBNP с анти-NPR1 моноклональными антителами при 37°C

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанног о Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb22033	401 ± 0,2	4	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22035	433 ± 0,5	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22805	389 ± 0,8	17	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb22809	397 ± 1,3	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	397 ± 0,9	2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25491	282 ± 0,9	4	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25497	327 ± 0,5	2	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25498	366 ± 0,6	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25502	384 ± 1,3	34	2,91E+05	9,98E-02	3,42E-07	0,12
mAb25508	342 ± 0,9	1	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
mAb25545	400 ± 0,4	4	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]
IgG4 изотипический контроль	348 ± 0,7	3	NB [§]	NB [§]	NB [§]	NB [§]

[§] Означает, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

* Означает, что наблюдаемые данные по связыванию неинформативны.

[#] Означает, что условия не были протестированы.

Как показано в табл. 3-6, выбранные анти-NPR1 антитела связываются с мономерным NPR1 человека и обезьяны.

Как показано в табл. 9-20, антитела связываются с димерным NPR1 человека и обезьяны как в присутствии, так и в отсутствие ANP или BNP.

Антитела не связываются с мышинным NPR1, за исключением mAb25502, которое связывается с mNPR1 в присутствии ANP/BNP (табл. 21-26).

Пример 4. Перекрестная конкуренция между выбранными моноклональными антителами-агонистам к NPR1.

Процедура проведения эксперимента.

Конкуренцию связывания в пределах панели анти-NPR1 моноклональных антител определяли с помощью анализа биослойной интерферометрии в реальном времени без метки на платформе биосенсора Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент выполняли при 25°C в 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Твин-20, 1 мг/мл BSA, буфер pH 7,4 (HBS-EBT), при встряхивании планшета со скоростью 1000 об/мин. Для оценки, способны ли 2 антитела конкурировать друг с другом за связывание с соответствующими эпитопами, 100 нМ рекомбинантного человеческого NPR1, экспрессируемого с С-концевым мышинным IgG2a (hNPR1-mFc; SEQ ID NO: 453), сначала инкубировали с 2 мкМ человеческого ANP в течение минимум 2 ч. Рекомбинантный комплекс hNPR1-mFc/hANP размером примерно 0,3-0,5 нм сначала захватывали погружением наконечников биосенсора Octet, покрытых антителами к мышинному Fc-фрагменту (ForteBio Inc, # 18-5090), путем погружения наконечников биосенсора на 45 с в лунки, содержащие комплекс hNPR1-mFc/hANP. Наконечники биосенсора с захваченным антигеном затем насыщали первым анти-NPR1 моноклональным антителом (называемым mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора mAb-1, на 5 мин. Затем наконечники биосенсора погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора второго анти-NPR1 моноклонального антитела (называемого mAb-2), на 3 мин. Между каждым этапом эксперимента наконечники биосенсора промывали буфером HBS-EBT. Реакцию связывания в реальном времени отслеживали в течение всего эксперимента, и в конце каждого этапа регистрировали реакцию связывания. Сравнивали реакцию связывания mAb-2 с hNPR1-mFc/hANP, находящимся в комплексе с mAb-1, и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных анти-NPR1 моноклональных антител.

Результаты.

Таблица 27
Перекрестная конкуренция между анти-NPR1
моноклональными антителами

mAb-1	Конкуренция mAb-2 с mAb-1
mAb25498	mAb25508
mAb25508	mAb25498
mAb22809	mAb22810
	mAb22033
	mAb25491
	mAb25497
	mAb25502
	mAb25545
	mAb22805
mAb22033	mAb25479
	mAb22809
	mAb25491
	mAb25497
	mAb25502
	mAb25545
	mAb22805
mAb25491	mAb25479
	mAb22810
	mAb22809
mAb25491	mAb22809
	mAb22033
	mAb25497

	mAb25502
	mAb25545
	mAb22805
	mAb25479
	mAb22810
mAb25497	mAb22809
	mAb22033
	mAb25491
	mAb25502
	mAb25545
	mAb22805
	mAb25479
	mAb22810
mAb25502	mAb22809
	mAb22033
	mAb25491
	mAb25497
	mAb25545
	mAb22805
	mAb25479
	mAb22810
mAb25545	mAb22809
	mAb22033
	mAb25491
	mAb25497
	mAb25502
	mAb22805
	mAb25479
	mAb22810
mAb22805	mAb22809
	mAb22033
	mAb25491
	mAb25497
	mAb25502
	mAb25545
	mAb22810
mAb25479	mAb22809
	mAb22033
	mAb25491
	mAb25497
	mAb25502
	mAb25545
	mAb22810
mAb22810	mAb22809
	mAb25445

В табл. 27 показана перекрестная конкуренция между выбранными анти-NPR1 антителами.

Пример 5. Связывание антител с клетками, экспрессирующими NPR1.

Процедура проведения эксперимента.

Способность моноклональных антител к человеческому (h)NPR1 связываться с клетками, экспрессирующими человеческий NPR1 (hNPR1), с одним из лигандов - человеческим ANP (hANP) или без него, определяли путем детектирования на основе электрохемилюминесценции (ECL).

Вкратце, клетки, экспрессирующие HEK293/hNPR1.мус.DDK, были сконструированы путем трансфекции клеток эмбриональной почки человека (HEK) 293, устойчивых к неомицину, экспрессионной плазмидой pLVX.hNPR1.мус.DDK, кодирующей человеческий NPR1 (аминокислоты M1-G1061, UniProtKB - P16066). Нетрансфицированные клетки HEK293, которые не имеют экспрессии NPR1, детектируемой с помощью сортировки флуоресцентно активированных клеток (FACS) с коммерческими антителами к α -hNRP1, были включены в качестве контроля неспецифического связывания.

Эксперименты выполняли в соответствии со следующей процедурой. Клетки из описанных выше линий промывали один раз в буфере $1 \times$ PBS без $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ и инкубировали в течение 10 мин при 37°C с раствором для диссоциации клеток, не содержащим ферментов, для отделения клеток от пробирки. Все

клетки промывали один раз $1 \times \text{PBS}$ с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ и подсчитывали с помощью счетчика клеток Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom Bioscience). Приблизительно $2,0 \times 10^4$ клеток HEK293/hNPR1.myc.DDK или HEK293 высевали отдельно в 96-луночные планшеты с угольными электродами (планшет с высоким связыванием MULTI-ARRAY, Meso Scale Discovery (MSD, Rockville, MD)) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C . Участки неспецифического связывания блокировали 2% BSA (мас./об.) в $1 \times \text{PBS}$ с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ в течение 1 ч при комнатной температуре (RT). Клетки HEK293/hNPR1.myc.DDK инкубировали в течение 0,5 ч при комнатной температуре в буфере для разведения образцов с 10 нМ человеческого ANP или без него (Tocris, Minneapolis, MN) и клетки HEK293 инкубировали в буфере для разведения образцов только в тех же условиях. Без промывки к связанным с планшетом клеткам на 1 ч при комнатной температуре добавляли серийные разведения анти-NPR1 антител, COMP1 или изотипический контроль в диапазоне от 1,7 пМ до 100 нМ или буфер, не содержащий антител. Затем планшеты промывали для удаления несвязавшихся антител и/или hANP, используя устройство для промывки планшетов AquaMax2000 с головкой для промывки клеток (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA). Связанные с планшетом антитела выявляли с помощью конъюгированных с SULFO-TAG козьих поликлональных антител к человеческому IgG, специфических к тяжелым и легким цепям (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), в течение 1 ч при RT.

После промывки планшеты проявляли с помощью буфера для считывания (MSD, Rockville, MD) в соответствии с процедурой, рекомендованной производителем, и люминесцентные сигналы регистрировали с помощью SECTOR Imager 600 (MSD, Rockville, MD). Интенсивность люминесценции, измеренную в относительных световых единицах (RLU), регистрировали для определения интенсивности связывания каждого антитела в диапазоне концентраций. Уровень сигнала, обнаруженного при связывании 3,7 нМ антитела с клетками, сконструированными для экспрессии NPR1, с 10 нМ hANP или без него, относительно такой же концентрации антитела, связывающегося с родительскими клетками без добавления hANP, регистрировали в качестве показателя специфичности связывания NPR1. Антитела с коэффициентом связывания, превышающим или равным 3, классифицировали как специфические связывающие вещества, а антитела с коэффициентом связывания менее 3 классифицировали как несвязывающие вещества.

Кроме того, анализировали сигналы прямого связывания (RLU) как функцию концентрации антитела, и данные подгоняли с помощью сигмоидальной (четырёхпараметрической логистической) модели доза-ответ с помощью статистического пакета R (открытый исходный код). Значение EC_{50} , определяемое как концентрация антитела, при которой выявляется 50% максимального сигнала связывания, определяли для указания способности связывания с клетками, сконструированными для экспрессии NPR1, с 10 нМ hANP или без него. В табл. 28 представлены значения EC_{50} только для конкретных связывающих веществ и отмечены (-) для антител с уровнем ниже 3.

Результаты.

В табл. 28 показано связывание выбранных анти-NPR1 антител с клетками, сконструированными для экспрессии человеческого NPR1 или комплекса NPR1-ANP.

Таблица 28

Связывание анти-NPR1 антител с клетками, сконструированными для экспрессии человеческого комплекса NPR1 или NPR1-ANP на поверхности клетки

PID Ab	Уровень сигнала связывания (RLU) с клетками HEK293/hNPR1.мус.DDK при концентрации антител 3,7 нМ относительно родительских HEK293		Способность связывания с клетками HEK293/hNPR1.мус.DDK, EC ₅₀ (M)	
	+ 10 нМ hANP	0 hANP	+ 10 нМ hANP	0 hANP
Пептид-зависимые связывающие NPR1				
mAb22809	166	2	4,8E-10	-
mAb22805	222	1	6,5E-10	-
mAb25545	79	1	1,9E-09	-
mAb22810	24	1	3,7E-09	-
mAb25502	14	1	INC	-
Comparator1	103	2	1,5E-10	-
Пептид-независимые связывающие NPR1				
mAb22033	236	207	8,2E-10	4,9E-10
mAb25497	87	50	8,7E-10	1,5E-09
mAb22035	220	151	8,9E-10	2,3E-09
mAb25491	78	58	1,0E-09	1,6E-09
mAb25479	51	30	1,2E-09	1,7E-09
mAb25508	35	18	1,3E-09	INC
mAb25498	49	41	1,8E-09	4,6E-09
hIgG4 изотипический контроль	1	1	-	-

(INC) = неинформативно, отсутствует верхнее плато на четырехпараметрической сигмоидальной кривой, подогнанной для вычисления значения EC₅₀, но антитело специфически связывалось с клетками, сконструированными для экспрессии NPR1, с 10 нМ hANP или без него с уровнем, равным или более высоким, чем 3.

Согласно результатам в табл. 28 все анти-NPR1 антитела специфически связывались с клетками, сконструированными для экспрессии hNPR1, в присутствии 10 нМ hANP с соотношением ≥ 2 . Эффективность этих антител в отношении клеток HEK293/hNPR1 мус.DDK с 10 нМ hANP находилась в пределах значений EC₅₀ от 0,15 до 3,7 нМ. Пять антител и Компаратор 1 специфически связывались с клетками, сконструированными для экспрессии NPR1, только в присутствии 10 нМ hANP и были классифицированы как пептид-зависимые связывающие NPR1. Остальные семь антител связывались с клетками, сконструированными для экспрессии hNPR1, с 10 нМ hANP и без него, и эти антитела были классифицированы как пептид-независимые связывающие NPR1. Эффективность этих антител в отношении клеток HEK293/hNPR1.мус.DDK без добавления hANP находилась в пределах значений EC₅₀ от 0,49 до 4,6 нМ.

Пример 6. Активация NPR1 моноклональными антителами-агонистами NPR1.

Процедура проведения эксперимента.

Для оценки транскрипционной активации человеческого рецептора натрийуретического пептида 1 (hNPR1), создавали стабильную клеточную линию, стабильно экспрессирующую циклический нуклеотид-управляемый канал альфа 2 (CNGA2) и hNPR1 в HEK293. CNGA2 представляет собой кальциевый канал, который может быть активирован cGMP, поэтому его можно использовать в качестве сенсора для генерации cGMP (Wunder et al. 2005, PMID:15766716). Поскольку NPR1 активируется лигандом и продуцирует cGMP (Zois et al., 2014, PMID:24820868), активируется CNGA2, и приток кальция можно измерить с помощью флуоресцентного индикатора Ca⁺⁺. Выполняли сортировку клеточной линии по высокому уровню экспрессии hNPR1, HEK293/hNPR1.МусDDK/CNGA2.Мус HS или сокращенно HEK293/CNGA2/hNPR1, и поддерживали в DMEM, содержащей 10% FBS, NEAA, пенициллин/стрептавидин/глутамат, 100 мкг/мл гигромицина и 500 мкг/мл сульфата G418.

Для измерения влияния анти-hNPR1 антител на передачу сигналов человеческого NPR1 в отсутствие ANP выполняли биоанализ. Для биоанализа клетки HEK293/CNGA2/hNPR1 высевали в планшеты PDL с черным прозрачным дном по 30000 клеток/лунку в DMEM, содержащей 10% FBS, NEAA, пени-

циллин/стрептавидин/глутамат, и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. На следующее утро среду удаляли, и в клетки добавляли 80 мкл буфера для анализа FLUO4-NW с пробенцидом (Thermo Scientific) на 30 мин при 37°C. Очищенные анти-hNPR1 антитела или антитело изотипического контроля серийно разводили в соотношении 1:3 от ~0,4 нМ до 1 мкМ (8 точек) или ANP в соотношении 1:3 от ~0,3 пМ до 2 нМ (10 точек), переносили в аналитический планшет, используя FLIPR TETRA® (Molecular Devices). Получали изображения базовой линии и ответа. Кривую зависимости доза-ответ определяли на основе Max-Min или площади под кривой (показано в описании) и результаты анализировали с помощью нелинейной регрессии (4-параметрическая логистическая кривая), используя программное обеспечение Prism 6 (GraphPad) с получением значений EC₅₀. % активации антител рассчитывали с максимальным диапазоном RFU (относительных единиц флуоресценции), достигаемым антителом, относительно максимального диапазона RFU, достигаемого ANP.

Результаты.

В табл. 29 показана активация человеческого NPR1 анти-NPR1 антителами.

Таблица 29

Активация человеческого NPR1 анти-NPR1 антителами				
	Эксперимент I		Эксперимент II	
Клетки	293/CNGA2/hNPR1		293/CNGA2/hNPR1	
Режим	Активация		Активация	
Лиганд	ANP		ANP	
EC₅₀ (пМ)	60,5-98,8		78,8	
Константа	нет		нет	
Антитело	EC₅₀ (нМ)	% активации (vs. ANP макс.)	EC₅₀ (нМ)	% активации (vs. ANP макс.)
mAb22033	83,7	129,54	41,6	129,20%
mAb22810	Не тестиру.	Не тестиру.	50,8	125,50%
mAb25545	187,9	123,14%	74,1	122,70%
mAb25502	161,4	92,90%	>200	109,80%
mAb22805	239	91,61%	112,3	118,90%
mAb22809	270	86,72%	Не тестиру.	Не тестиру.
mAb25491	101,8	74,64%	43,4	103,70%
mAb22035	383,9	73,07%	>200	56,80%
mAb25497	72,62	71,09%	56,4	103,40%
mAb25498	335,3	67,74%	Не тестиру.	Не тестиру.
mAb25479	174,3	66,73%	101,9	82,80%
mAb25508	325,7	56,08%	Не тестиру.	Не тестиру.
Компаратор 1	>2000	53,45%	Активации нет	13,80%
Изотипический контроль	Активации нет	-6,03%	Активации нет	1,90%

Активацию hNPR1 выбранными анти-NPR1 антителами по изобретению тестировали путем измерения активности кальциевого потока в HEK293/CNGA2/hNPR1 в двух экспериментах (экспериментах I и II) (табл. 29). Как показано в табл. 29 (в эксперименте I), 11 очищенных анти-NPR1 антител показали активацию в потоке Ca²⁺ с максимальной активацией в диапазоне от 55 до 130% с EC₅₀ в диапазоне 83,7-383,9 нМ. 19 антител показали слабую активацию с максимальной активацией менее 31% (данные не показаны). В эксперименте II 9 анти-NPR1 антител показали активацию в потоке Ca²⁺ с максимальной активацией в диапазоне от 57-129% с EC₅₀ 41,6 - >200 нМ (табл. 29). ANP активируется с EC₅₀ 60,5-98,8 пМ. Активация не наблюдалась с антителом изотипического контроля hIgG4.

Пример 7. Влияние одной дозы моноклонального антитела-агониста NPR1 на системное артериальное давление у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}.

Процедура проведения эксперимента.

Цель этого исследования заключалась в оценке влияния выбранных антител-агонистов NPR1 на исходное системное артериальное давление у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем. Самцам мышей NPR1^{hu/hu} (n=50) в возрасте ~10-20 недель имплантировали телеметрические датчики PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) и давали возможность восстановиться в течение 7 дней перед распреде-

лением по группам (группы 1-12) (табл. 30).

Таблица 30

Сводная информация о дозах и группах доз

№ группы	Тестируемый или контрольный продукт	Уровень дозы (мг/мг/доза)	Объем дозы (мл/кг)	количество животных
				самцы
1	PBS контроль	25	5	9
3	mAb22035			5
4	mAb22033			4
5	mAb25497			3
6	mAb22805			4
7	mAb25545			3
8	mAb22809			5
9	mAb25479			4
10	mAb25491			4
11	mAb25502			5
12	mAb22810			4

Животных содержали по одному в стандартных условиях (температура от 64 до 84°F (от 18 до 29°C); относительная влажность от 30 до 70%), и поддерживали цикл 12-часовой день/12-часовая ночь. Пища (гранулированный корм Research Diets Standard) и вода находились в свободном доступе (ad libitum).

Тестируемые белки или фосфатно-солевой буфер (PBS) вводили соответствующим животным в виде одной подкожной инъекции в день 0. Объем дозы для каждого животного определяли на основе самого последнего измерения массы тела.

Во время тестирования систолическое давление, диастолическое давление, среднее артериальное давление и частоту сердечных сокращений регистрировали в течение 10 с каждую минуту. Оценку эффективности выполняли, используя данные, собранные с 3-го по 7-й день исследования. Длительные эффекты антител-агонистов NPR1 оценивали, используя данные, которые регистрировали ежедневно в течение 24 ч и усредняли за 28 дней. Все данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM).

Результаты.

Первичный скрининг *in vivo* антител-агонистов NPR1 продемонстрировал, что по сравнению с контрольными животными, которым вводили PBS, через 3-7 дней после введения дозы влияние 9 антител (mAb22033, mAb25479, mAb25497, mAb22805, mAb25545, mAb22809, mAb25491, mAb25502 и mAb22810), значительно уменьшилось, а одно антитело (mAb22035) не оказало никакого влияния на системное артериальное давление (фиг. 1). Величина снижения артериального давления, оцененная по среднему изменению (через 3-7 дни после введения дозы) систолического артериального давления относительно исходного уровня, варьировала от $-3,2 \pm 0,2$ (mAb25497N) до $-11,5 \pm 0,8$ (mAb22810) мм рт. ст. (mmHg)

Длительные эффекты антител-агонистов NPR1 оценивали в течение 28 дней (табл. 31).

Таблица 31

28-дневное среднее артериальное давление и частота сердечных сокращений

Группа дозирования	систолическое (mmHg)	диастолическое (mmHg)	Среднее артериальное (mmHg)	ЧСС (BPM)
PBS контроль	0,08 \pm 0,09	1,09 \pm 0,25	1,19 \pm 0,27	11,79 \pm 3,17
mAb25545	-4,34 \pm 0,18*	0,13 \pm 0,38*	-2,0 \pm 0,46*	5,35 \pm 3,13*
mAb22805	-3,90 \pm 0,17*	-1,51 \pm 0,30*	-3,40 \pm 0,40*	18,83 \pm 2,73*
mAb25497	-3,04 \pm 0,20*	2,37 \pm 0,36*	1,04 \pm 0,44	12,07 \pm 2,64*
mAb22035	3,80 \pm 0,32*	2,05 \pm 0,22*	2,95 \pm 0,26*	2,86 \pm 2,33*
mAb22033	-11,07 \pm 0,59*	-4,55 \pm 0,38*	-8,01 \pm 0,48*	-2,14 \pm 2,83*
mAb22810	-7,88 \pm 0,57*	-2,24 \pm 0,31*	-5,21 \pm 0,42*	-6,10 \pm 2,96*
mAb25502	-3,63 \pm 0,49*	-0,41 \pm 0,40*	-2,13 \pm 0,44*	-14,27 \pm 2,87*
mAb22809	-2,01 \pm 0,58*	2,95 \pm 0,70*	0,30 \pm 0,62	3,95 \pm 2,33*
mAb25491	-4,90 \pm 0,35*	-1,22 \pm 0,26*	-3,19 \pm 0,30*	-12,9 \pm 3,22*
mAb25479	-3,44 \pm 0,50*	0,51 \pm 0,42*	-1,60 \pm 0,44*	-4,01 \pm 3,03*

Нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем распределяли по группам в зависимости от массы тела. Животным вводили одну подкожную инъекцию 25 мг/кг mAb-агониста NPR1 или контрольного PBS, как описано в табл. 1. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=3-9 на группу. Статистика -двусторонний ANOVA с критерием Даннета; *p<0,05 по сравнению с контролем PBS

После одной подкожной инъекции в день 0 одно антитело (mAb22035) значительно увеличивало давление на ~4-7 мм рт.ст., в то время как другие антитела снижали системное артериальное давление на 2-11 мм рт.ст. у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}. Реакция частоты сердечных сокращений как на повышенное, так и на пониженное системное артериальное давление была различной: в некоторых группах она повышалась, а в других группах снижалась.

Пример 8. Влияние дозы моноклонального антитела-агониста NPR1 на системное артериальное давление у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu}.

Процедура проведения эксперимента.

Цель этого исследования заключалась в оценке эффекта дозы антитела-агониста NPR1 mAb22033 на системное артериальное давление у нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем. Мышам-самцам NPR1^{hu/hu} (n=30) в возрасте ~20 недель имплантировали телеметрические датчики PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) и давали возможность восстановиться в течение 7 дней перед распределением по группам (группы 1-5). (табл. 32).

Таблица 32

Сводная информация о дозах и группах доз

№ группы	Тестируемый или контрольный продукт	Уровень дозы (мг/мг/доза)	Объём дозы (мл/кг)	количество животных
				самцы
1	Изотипический контроль IgG4	25	5	6
2	mAb22033	1	5	7
3	mAb22033	5	5	6
4	mAb22033	25	5	7
5	mAb22033	50	5	7

Животных содержали по одному в стандартных условиях (температура от 64 до 84°F (от 18 до 29°C); относительная влажность от 30 до 70%) и поддерживали цикл 12-часовой день/12-часовая ночь. Пища (гранулированный корм Research Diets Standard) и вода находились ad libitum.

Тестируемые белки вводили соответствующим животным в виде одной подкожной инъекции в день 0. Объём дозы для каждого животного определяли на основе самого последнего измерения массы тела. Для оценки биомаркеров мочи и сыворотки в день 28 собирали мочу, а образцы крови собирали в день 14 исследования и по окончании эксперимента. Эхокардиографию выполняли в день 28 до диуреза.

Во время тестирования систолическое давление, диастолическое давление, среднее артериальное давление и частоту сердечных сокращений регистрировали в течение 10 с каждую минуту. Графически отображаемые телеметрические данные получали от животных с четкими сигналами в части исследования живых мышей.

Результаты.

Артериальное давление (фиг. 2, 3 и 5) снижалось на 10-15 мм рт. ст. на срок до 4 недель после введения одной дозы mAb22033 нормотензивным мышам NPR1^{hu/hu}. Пиковое снижение давления для всех доз было одинаковым, при этом продолжительность эффекта на артериальное давление составляла приблизительно 10 дней при введении 1 мг/кг и более 28 дней при введении 50 мг/кг.

Таблица 33

28-дневное среднее артериальное давление и частота сердечных сокращений

Группа дозирования	систолическое (mmHg)	диастолическое (mmHg)	Среднее артериальное	ЧСС (BPM)
--------------------	----------------------	-----------------------	----------------------	-----------

			(mmHg)	
Изотипический контроль IgG4 (25 мг/кг)	126±,3	97,0±0,3	112,2±0,3	524,9±3,2
mAb22033 (1 мг/кг)	124,4±0,5	95,1±0,4	110,4±0,4	530,6±4,0
mAb22033 (5 мг/кг)	120,0±0,4****	93,8±0,3**	107,6±0,3****	543,4±4,0** **
mAb22033 (25 мг/кг)	119,7±0,5****	93,7±0,4*	107,1±0,4****	524,5±3,4
mAb22033 (50 мг/кг)	118,5±0,5****	94,2±0,3*	106,8±0,3****	553,6±3,5** **

Нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем случайным образом делили на пять групп с равной массой тела, и им вводили одну подкожную инъекцию mAb22033 в дозах, перечисленных в табл. 1. Антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение ± SEM, n=6-7 на группу. Статистика - двусторонний ANOVA с критерием Даннета; *p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем IgG4, **p<0,01 по сравнению с изотипическим контролем IgG4; ***p<0,001 по сравнению с изотипическим контролем IgG4; ****p<0,0001 по сравнению с изотипическим контролем IgG4

Концентрации cGMP в моче (табл. 34) были значительно увеличены на 28 день в группе 50 мг/кг, при этом все другие дозы были на уровне, аналогичном контролю.

Таблица 34

Маркеры мочи и сыворотки

Группа дозирования:	Объем мочи (мл/сутки)	cGMP в моче (ммоль/сутки)	NTproANP в сыворотке (нмоль/л) - день 14	NTproANP в сыворотке (нмоль/л) - день 29
Изотипический контроль IgG4 (25 мг/кг)	1,4±0,2	5,0±1,3	0,21±0,06	0,49±0,17
mAb22033 (1 мг/кг)	1,2±0,2	5,2±1,3	0,35±0,11	0,52±0,12
mAb22033 (5 мг/кг)	0,9±0,1	3,7±0,8	0,20±0,08	0,20±0,05
mAb22033 (25 мг/кг)	1,2±0,2	5,9±0,8	0,14±0,06	0,24±0,06
mAb22033 (50 мг/кг)	1,4±0,2	11,9±2,1**	0,26±0,08	0,56±0,20

Нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем случайным образом делили на пять групп с равной массой тела, и им вводили одну подкожную инъекцию mAb22033 в дозах, перечисленных в табл. 1. Антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение ± SEM, n=6-7 на группу. Статистика - односторонний ANOVA с критерием Даннета; **p<0,01 по сравнению с изотипическим контролем IgG4.

Относительная масса сердца (табл. 35) была ниже в группе 50 мг/кг с тенденцией к снижению в группах 1, 5 и 25 мг/кг. Отсутствовало значительное влияние на массу тела (табл. 35), абсолютную массу сердца (табл. 35), химический состав стандартной сыворотки (ALT, AMYLAS, AST, CHOL, CKNAC, CREA, DHDL, IP, TRIG, TP, UA, UN, MG, NEFA) или мочи (ALB, GLUH, CREA, PRO, CA, IP, MG, UN, AMYLAS, UA, NA, K, CL).

Таблица 35

Конечные массы тела и органов

Группа дозирования:	Конечная масса тела (г)	масса сердца (мг)	Масса сердца: длина большеберцовой кости	Масса сердца:масса тела
Изотипический контроль IgG4 (25 мг/кг)	33,1±1,7	0,143±0,003	0,0079±0,0002	0,0043±0,0001
mAb22033 (1 мг/кг)	34,5±2,3	0,140±0,005	0,0078±0,0002	0,0041±0,0001
mAb22033 (5 мг/кг)	34,3±1,4	0,131±0,006	0,0075±0,0004	0,0039±0,0003
mAb22033 (25 мг/кг)	32,4±1,4	0,126±0,006	0,0071±0,0003	0,0039±0,0002
mAb22033 (50 мг/кг)	34,3±2,1	0,124±0,004	0,0069±0,0002	0,0037±0,0002*

Нормотензивных мышей NPR1^{hu/hu} с телеметрическим контролем случайным образом делили на пять групп с равной массой тела, и им вводили одну подкожную инъекцию mAb22033 в дозах, перечис-

ленных в табл. 1. Антитело IgG4 использовали в качестве изотипического контроля. Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, $n=6-7$ на группу. Статистика - односторонний ANOVA с критерием Даннета; $*p<0,05$ по сравнению с изотипическим контролем IgG4

Функция миокарда (фиг. 6 и 7A) улучшилась после введения mAb22033 со статистически значимым снижением конечного систолического объема, отмеченным в группе дозы 25 мг/кг (фиг. 7A) и тенденцией к увеличению как фракции укорочения (фиг. 7C), так и фракции выброса (фиг. 7B), наиболее очевидные в группах 25 и 50 мг/кг.

Ключевые результаты заключаются в том, что mAb-агонист NPR1 mAb22033 вызывало значительное снижение систолического и среднего артериального давления крови, которое длилось до 28 дней. Компенсаторное увеличение частоты сердечных сокращений первоначально наблюдалось во всех группах с постоянным незначительным увеличением в группе, получавшей mAb22033 в дозе 50 мг/кг, относительно mAb изотипического контроля.

Пример 9. Влияние одной дозы моноклонального антитела-агониста NPR1 на системное артериальное давление у гипертензивных мышей NPR1^{hu/hu}.

Процедура проведения эксперимента.

Цель этого исследования заключалась в оценке эффектов одной дозы антитела-агониста NPR1 (mAb22033 или mAb22810) на системное артериальное давление у мышей NPR1^{hu/hu} с ангиотензин II-индуцированной (Ang II) гипертензией, находящихся под телеметрическим контролем. Самцам мышей NPR1^{hu/hu} ($n=36$) в возрасте ~13 недель имплантировали телеметрические датчики PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) и давали возможность восстановиться в течение 7 дней перед распределением по группам (группы 1-6) (табл. 36).

Таблица 36

Сводная информация о дозах и группах доз

№ группы	Тестируемый или контрольный продукт	Уровень дозы (мг/мл)	Объем дозы (мл/кг)	количество животных
				самцы
1	Изотипический контроль IgG4	25	5	5
2	mAb22033	1	5	4
3	mAb22033	5	5	5
4	mAb22033	25	5	6
5	mAb22810	5	5	5
6	mAb22810	19	5	6

Затем животным имплантировали осмотические мини-насосы (микроосмотический насос Alzet; модель 1004; лот 10335-14). Мини-насосы заполняли ацетатной солью ангиотензина II (Bachem; лот # 1066804) и настраивали на среднюю скорость закачки 0,11 мкл/ч для доставки 1,5 мг/кг/сутки Ang II. Мини-насосы имплантировали подкожно в область лопатки за 3 дня до начала дозирования. Животных содержали по одному в стандартных условиях (температура от 64 до 84°F (от 18 до 29°C); относительная влажность от 30 до 70%) и поддерживали цикл 12-часовой день/12-часовая ночь. Пища (гранулированный корм Research Diets Standard) и вода находились ad libitum.

Тестируемые белки вводили подкожно соответствующим животным один раз на 3-й день путем подкожной инъекции. Объемы доз для каждого животного определяли на основе самого последнего измерения массы тела.

Во время тестирования систолическое давление, диастолическое давление, среднее артериальное давление и частоту сердечных сокращений регистрировали в течение 10 с каждую минуту. Мочу собирали в дни 14 и 20.

Результаты.

Одна доза mAb-агониста NPR1 (mAb22033 или mAb22810) значительно снижала системное артериальное давление (фиг. 8, 9 и 11) при введении мышам NPR1^{hu/hu} с индуцированной ангиотензином-II гипертензией. Все значения 23-дневного среднего артериального давления (табл. 37) были значительно ниже у животных, которые получали либо mAb22033, либо mAb22810, по сравнению с изотипическим контролем IgG4.

Таблица 37

23-дневное среднее артериальное давление и частота
сердечных сокращений

Группа дозирования:	Систолическое (ммНг)	Диастолическое (ммНг)	Среднее артериальное (ммНг)	ЧСС (ВРМ)
Изотипический контроль IgG4 (25 мг/кг)	176±2	147±2	155±2	507±4
mAb22033 (1 мг/кг)	163±2****	134±2****	147±2	541±4****
mAb22033 (5 мг/кг)	153±2****	120±1****	132±4****	547±7****
mAb22033 (25 мг/кг)	149±2****	121±1****	131±4****	544±7****
mAb22810 (5 мг/кг)	162±2****	128±2****	145±2*	532±5**
mAb22810 (19 мг/кг)	159±2****	127±2****	139±3***	532±4**

Все значения представляют собой среднее значение ± SEM, n=3-6 на группу. Статистика - двусторонний ANOVA с критерием Даннета; *p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем IgG4 **p<0,01 по сравнению с изотипическим контролем IgG4; ***p<0,001 по сравнению с изотипическим контролем IgG4; ****p<0,0001 по сравнению с изотипическим контролем IgG4.

Таблица 38

Биомаркеры мочи и сыворотки

Группа дозирования:	Объем мочи (мл/сутки)	сGMP в моче (ммоль/сутки)	Объем мочи (мл/сутки)	сGMP в моче (ммоль/сутки)	NTproANP в плазме (нмоль/л) -
	- День 14) - день 14	- День 20) - день 20	день 20
Изотипический контроль IgG4 (25 мг/кг)	2,2±0,7	8,7±2,5	5,2±0,9	13,9±3,1	0,7±0,1
mAb22033 (1 мг/кг)	3,0±0,7	13,8±2,3	6,6±0,6	23,4±2,8	0,8±0,2
mAb22033 (5 мг/кг)	1,3±0,5	11,0±3,2	3,9±0,3	20,8±0,8	1,0±0,3
mAb22033 (25 мг/кг)	2,1±0,3	23,5±5,3*	5,6±0,8	44,9±7,8****	1,5±0,2
mAb22810 (5 мг/кг)	1,5±0,4	8,3±2,0	4,1±0,8	19,2±5,3	1,3±0,4
mAb22810 (19 мг/кг)	2,3±0,3	13,6±1,8	4,9±0,7	18,8±1,9	1,0±0,2

Все значения представляют собой среднее значение ± SEM, n=3-6 на группу. Статистика - односторонний ANOVA с критерием Даннета. *p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем IgG4; ***p<0,001 по сравнению с изотипическим контролем IgG4.

Таблица 39

Конечные массы тела и органов

Группа дозирования:	Конечная масса тела (г)	Масса сердца (мг)	Масса	Масса
			сердца:длина большеберцовой кости	сердца:масса тела
Изотипический контроль IgG4 (25 мг/кг)	29±1	0,166±0,011	0,0093±0,0006	0,0057±0,0003
mAb22033 (1 мг/кг)	32±1	0,168±0,005	0,0094±0,0004	0,0053±0,0003
mAb22033 (5 мг/кг)	29±2	0,149±0,017	0,0085±0,0009	0,0051±0,0005
mAb22033 (25 мг/кг)	32±1	0,162±0,008	0,0090±0,0004	0,0051±0,0002
mAb22810 (5 мг/кг)	30±1	0,150±0,004	0,0084±0,0002	0,0050±0,0001
mAb22810 (19 мг/кг)	30±1	0,146±0,015	0,0082±0,0008	0,0049±0,0003

Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=3-6 на группу. Статистика - двусторонний ANOVA с критерием Даннета.

Эффекты частоты сердечных сокращений (фиг. 10) резко увеличивались с более умеренным хроническим увеличением. Средняя 23-дневная частота сердечных сокращений (табл. 37) была значительно выше во всех группах, которым вводили испытуемый препарат, по сравнению с животными изотипического контроля. Уровни cGMP в моче имели тенденцию к повышению в большинстве групп, которым вводили либо mAb22033, либо mAb22810, при этом животные, получавшие mAb22033 в дозе 25 мг/кг, в дни 14 и 20 имели значительно более высокие уровни cGMP в моче по сравнению с животными изотипического контроля IgG (табл. 38). Воздействия на массу тела, абсолютную или относительную массу органов не наблюдали (табл. 39).

Пример 10. Влияние повторных доз моноклонального антитела-агониста NPR1 на системное артериальное давление у гипертензивных мышей NPR1^{hu/hu}.

Процедура проведения эксперимента.

Цель этого исследования заключалась в оценке эффектов повторного дозирования антитела-агониста NPR1 mAb22033 на системное артериальное давление у мышей NPR1^{hu/hu} с ангиотензин II (Ang II)-индуцированной гипертензией, находящихся под телеметрическим контролем. Самцам мышей NPR1^{hu/hu} (n=30) в возрасте ~26 недель имплантировали телеметрические датчики PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) и давали возможность восстановиться в течение 7 дней перед распределением по группам (группы 1-5) (табл. 40).

Таблица 40

Сводная информация о дозах и группах доз

№ группы	Тестируемый или контрольный продукт	Уровень дозы (мг/мг/доза)	Объем дозы (мл/кг)	количество
				о животных самцы
1	Изотипический контроль IgG4	25	5	6
2	mAb22033	1	5	6
3	mAb22033	5	5	6
4	mAb22033	25	5	6
5	mAb22033	50*	5	6

* Одна доза.

Затем животным имплантировали осмотические мини-насосы (микроосмотический насос Alzet; модель 1004; лот 10335-14). Мини-насосы заполняли ацетатной солью ангиотензина II (Bachem; лот # 1066804) и настраивали на среднюю скорость закачки 0,11 мкл/ч для доставки 1,5 мг/кг/сутки Ang II. Мини-насосы имплантировали подкожно в область лопатки за 7 дней до начала дозирования. Животных содержали по одному в стандартных условиях (температура от 64 до 84°F (от 18 до 29°C); относительная влажность от 30 до 70%) и поддерживали цикл 12-часовой день/12-часовая ночь. Пища (гранулированный корм Research Diets Standard) и вода находились ad libitum.

Животных делили на группы на основе систолического артериального давления. Тестируемые белки вводили подкожно соответствующим животным либо один раз в день 0 (группа 5), либо два раза в неделю в течение трех недель (группы 1-4) начиная со дня 6 путем подкожной инъекции. Объемы доз для каждого животного определяли на основе самого последнего измерения массы тела.

Во время тестирования систолическое давление, диастолическое давление, среднее артериальное давление и частоту сердечных сокращений регистрировали в течение 10 с каждую минуту.

Результаты.

У мышей NPR1^{hu/hu} с индуцированной ангиотензином II гипертензией одна или повторные дозы mAb-агониста NPR1 mAb22033 снижали системное кровяное давление (фиг. 12, 13 и 15) до близкого к нормальному уровню. Повторные дозы 1, 5 или 25 мг/кг mAb22033 снижали систолическое артериальное давление дозозависимым образом с пиковым снижением по сравнению с исходными значениями в каждой группе на 11, 19 и 39 мм рт. ст. соответственно после 3-недельного введения дважды в неделю. Одна доза 50 мг/кг снизила систолическое артериальное давление на 31 мм рт. ст. к 7-му дню с постепенным возвратом к более гипертоническим уровням. Среднее 21-дневное артериальное давление (табл. 41) было значительно ниже у животных, получавших одну или повторные дозы mAb22033, по сравнению с изотипическим контролем IgG4.

Таблица 41

21-дневное среднее артериальное давление и частота сердечных сокращений

Группа дозирования:	Систолическое (ммHg)	Диастолическое (ммHg)	Среднее артериальное (ммHg)	ЧСС (BPM)
Изотипический контроль IgG4 (25 мг/кг)	173,4±1,3	138,6±0,7	154,9±1,2	538,2±1,8
mAb22033 (1 мг/кг)	163,0±1,2**	132,9±1,0	146,8±1,0**	532,5±3,2
mAb22033 (5 мг/кг)	151,9±0,9****	124,7±0,7****	137,8±0,8****	524,8±3,5**
mAb22033 (25 мг/кг)	149,1±2,2****	127,0±2,0***	137,1±2,0****	511,3±2,9****
mAb22033 (50 мг/кг)*одна доза*	156,2±1,4****	135,0±1,7	144,9±1,5****	552,4±3,1**

Все значения представляют собой среднее значение ± SEM, n=3-6 на группу. Статистика - двусторонний ANOVA с критерием Даннета; **p<0,01 по сравнению с изотипическим контролем IgG4; ***p<0,001 по сравнению с изотипическим контролем IgG4; ****p<0,0001 по сравнению с изотипическим контролем IgG4.

Таблица 42

Конечные массы тела и органов

Группа дозирования:	Конечная масса тела (г)	Масса сердца (мг)	Масса сердца:длина большеберцовой кости	Масса сердца:масса тела
Изотипический контроль IgG4 (25 мг/кг)	30,9±1,5	0,165±0,006	0,0091±0,00032	0,0054±0,0002
mAb22033 (1 мг/кг)	31,1±1,1	0,151±0,007	0,0084±0,00043	0,0049±0,0002
mAb22033 (5 мг/кг)	29,6±1,0	0,149±0,004	0,0082±0,00020	0,0050±0,0001
mAb22033 (25 мг/кг)	32,4±1,9	0,165±0,012	0,009±0,00067	0,0051±0,0003
mAb22033 (50 мг/кг)*одна доза*	31,0±1,3	0,153±0,006	0,0085±0,00034	0,0050±0,0003

Все значения представляют собой среднее значение ± SEM, n=3-6 на группу. Статистика - односторонний ANOVA с критерием Даннета.

Таблица 43

Маркеры мочи и сыворотки

Группа дозирования:	Объем мочи (мл/сутки)	cGMP в моче (ммоль/сутки)	NTproANP в сыворотке (нмоль/л) - День 20	NTproANP в сыворотке (нмоль/л) - День 29
Изотипический контроль IgG4 (25 мг/кг)	2,74±0,74	30,5±6,3	0,58±0,05	0,57±0,09
mAb22033 (1 мг/кг)	3,08±0,51	61,6±20,4	0,75±0,03	0,51±0,05
mAb22033 (5 мг/кг)	2,48±0,68	36,6±10,4	0,45±0,013	0,36±0,08
mAb22033 (25 мг/кг)	3,2±0,80	*106,3±25,4*	0,59±0,13	0,63±0,14
mAb22033 (50 мг/кг)*одна доза*	3,27±0,89	52,8±21,5	0,56±0,18	1,27±0,43

Все значения представляют собой среднее значение \pm SEM, n=3-6 на группу. Статистика - однофакторный ANOVA с критерием Даннета. *p<0,05 по сравнению с изотипическим контролем IgG4.

Были проанализированы острые эффекты mAb22033 со снижением давления на 10-20 мм рт.ст. в течение 24 ч после первой дозы. Эффекты сердечного ритма (фиг. 14) были переменными, причем в течение 21-дневного периода дозирования наблюдали более высокие и более низкие значения. Средняя частота сердечных сокращений за 21 день (табл. 41) была значительно ниже в группах с повторной дозой 5 и 25 мг/кг и имела тенденцию к увеличению в группе, получившей одну дозу 50 мг/кг. Уровни cGMP в моче были значительно увеличены в группе, получившей повторную дозу 25 мг/кг, при этом во всех других группах наблюдали тенденцию не статистически значимого увеличения по сравнению с животными, которым вводили mAb изотипического контроля IgG4 (табл. 43). Эффектов на массу тела, абсолютную или относительную массу органов, стандартные химические составы сыворотки или мочи или сердечную функцию не наблюдали (табл. 42 и фиг. 16, 17).

Пример 11. Влияние антител-агонистов NPR1 на массу тела, скорость метаболизма и гомеостаз глюкозы у мышей с ожирением, вызванным диетой (DIO).

Эксперимент 1.

В этом эксперименте тестировали влияние mAb-агониста NPR1 mAb22810 на массу тела, скорость метаболизма и гомеостаз глюкозы у мышей с ожирением, вызванным диетой (DIO).

30 самцов мышей NPR1^{hu/hu} были посажены на диету с высоким содержанием жиров 60% на 10 недель, после этого их случайным образом делили на три группы (n=10 на группу): антитело изотипического контроля (человеческий IgG4), антитело-агонист NPR1 mAb22810 или hFc.FGF21.FGF21, представляющее собой молекулу, которая, как было доказано, улучшает толерантность к глюкозе, увеличивает расход энергии и снижает массу тела на моделях мышей с ожирением (Véniant M.M., Endocrinology, 2012, PMID: 22798348). Последний препарат использовали в этом исследовании в качестве положительного контроля для конечных точек. Лечение выполняли, используя физиологический раствор, путем подкожной инъекции (S.C.) либо еженедельной (для контрольного антитела и mAb22810), либо два раза в неделю (для hFc.FGF21). В табл. 44 перечислены группы, количество животных и дозы, применяемые в исследовании.

Таблица 44

Сводная информация по группам лечения

Группа	Лечение	Доза	График дозирования	Мыши
1	контрольное mAb	25 мг/кг	1х/неделю, S.C.	10
2	mAb22810	25 мг/кг	1х/неделю, S.C.	10
3	hFc.FGF21	3.2 мг/кг	2х/неделю, S.C.	10

Перед дозированием и два раза в неделю после этого регистрировали массу тела каждой мыши. В течение второй недели исследования мышей помещали в метаболические клетки для оценки расхода энергии. Пероральную толерантность к глюкозе оценивали в течение третьей недели исследования и конституцию животного определяли через шесть недель лечения с помощью EchoMRI.

На фиг. 18А показаны изменения массы тела после введения mAb-агониста NPR1 mAb22810, hFc.FGF21 или mAb изотипического контроля. На фиг. 18В и 18С показаны общий уровень жира и общая мышечная масса соответственно после шести недель лечения, измеренные с помощью EchoMRI. Основные результаты заключаются в том, что, хотя молекула hFc.FGF21 вызывала значительное сниже-

ние массы тела и уменьшала ожирение в течение периода лечения, при введении антитела-агониста NPR1 mAb22810 этого не происходило.

На фиг. 19А-19С показаны изменения VO_2 (А), VCO_2 (В) или расход энергии (С) в разбивке по среднему значению по каждому циклу день/ночь после одной недели лечения любым из: mAb-агониста NPR1 mAb22810, hFc.FGF21 или mAb изотипического контроля. Основные результаты заключаются в том, что, хотя молекула hFc.FGF21 приводила к значительному увеличению VO_2 , VCO_2 и расхода энергии в течение периода лечения, при введении антитела-агониста NPR1 mAb22810 этого не происходило.

На фиг. 20А показаны изменения толерантности к глюкозе, измеренные с помощью перорального теста толерантности к глюкозе (2 г/кг глюкозы) после двух недель лечения либо mAb-агонистом NPR1 mAb22810, либо mAb hFc.FGF21, либо mAb изотипического контроля. На фиг. 20В показаны уровни глюкозы после ночного голодания, зарегистрированные в начале исследования в А. Основные результаты заключаются в том, что молекулы как mAb22810, так и hFc.FGF21 вызвали значительное улучшение толерантности к глюкозе через две недели. Кроме того, улучшение толерантности к глюкозе, обеспечиваемое mAb22810, не зависело от изменений массы тела или расхода энергии (как показано на фиг. 18 и 19).

Эксперимент 2.

Этот эксперимент описывает влияние mAb-агониста NPR1 mAb22033 на массу тела, скорость метаболизма и гомеостаз глюкозы у мышей с ожирением, вызванным диетой (DIO).

30 самцов мышей NPR1^{hu/hu} были посажены на диету с высоким содержанием жиров 60% на 10 недель, затем случайным образом поделены на три группы (n=10 на группу): антитело изотипического контроля (человеческий IgG4), антитело-агонист NPR1 mAb22033 или hFc.FGF21 в качестве положительного контроля. Лечение выполняли, используя физиологический раствор, путем подкожной инъекции (S.C.) либо еженедельно (для контрольного антитела и mAb22033), либо два раза в неделю (для hFc.FGF21). В табл. 45 перечислены группы, количество животных и дозы в исследовании.

Таблица 45

Сводная информация по группам лечения

Группа	Лечение	Доза	График дозирования	Мыши
1	контрольное mAb	25 мг/кг	1х/неделю, S.C.	10
2	mAb22033	25 мг/кг	1х/неделю, S.C.	10
3	hFc.FGF21	3,2 мг/кг	2х/неделю, S.C.	10

Перед дозированием и два раза в неделю после этого регистрировали массу тела каждой мыши. В течение второй недели исследования мышей помещали в метаболические клетки для оценки расхода энергии. Пероральную толерантность к глюкозе оценивали в течение третьей недели исследования, и конституцию животного определяли через шесть недель лечения с помощью EchoMRI.

На фиг. 21А показаны изменения массы тела после введения mAb-агониста NPR1 mAb22033, hFc.FGF21 или mAb изотипического контроля. На фиг. 21В и 21С показаны общий уровень жира и общая мышечная масса соответственно после шести недель лечения, измеренные с помощью EchoMRI. Основные результаты заключаются в том, что, хотя молекула hFc.FGF21 вызывала значительное снижение массы тела и уменьшала ожирение в течение периода лечения, при введении антитела-агониста NPR1 mAb22033 этого не происходило.

На фиг. 22А-22С показаны изменения VO_2 (А), VCO_2 (В) или расход энергии (С) в разбивке по среднему значению по каждому циклу день/ночь после одной недели лечения любым из: mAb-агониста NPR1 mAb22033, hFc.FGF21 или mAb изотипического контроля. Основные результаты заключаются в том, что, хотя молекула hFc.FGF21 приводила к значительному увеличению VO_2 , VCO_2 и расхода энергии в течение периода лечения, при введении антитела-агониста NPR1 mAb22033 этого не происходило.

На фиг. 23А показаны изменения толерантности к глюкозе, измеренные с помощью перорального теста толерантности к глюкозе (2 г/кг глюкозы) после двух недель лечения либо mAb-агонистом NPR1 mAb22033, либо mAb hFc.FGF21, либо mAb изотипического контроля. На фиг. 23В показаны уровни глюкозы после ночного голодания, зарегистрированные в начале исследования в А. Основные результаты заключаются в том, что молекулы как mAb22033, так и hFc.FGF21 вызвали значительное улучшение толерантности к глюкозе через две недели. Кроме того, улучшение толерантности к глюкозе, обеспечиваемое mAb22033, не зависело от изменений массы тела или расхода энергии (как показано на фиг. 21 и 22).

Пример 12. HDX картирование эпитопа.

Для определения эпитопов человеческого NPR1, распознаваемых анти-NPR1 антителами, mAb22033 и mAb22810, соответственно изучали с помощью водородно-дейтериевого обмена (HDX). Предыдущие эксперименты, выполненные в лаборатории, показали, что связывание NPR1 с mAb22810 требует присутствия пептида ANP. Следовательно, в дополнение к стандартному HDX эксперименту с использованием комплекса NPR1/mAb22033, также выполняли HDX эксперименты для комплексов

NPR1/ANP/mAb22033 и NPR1/ANP/mAb22810.

Для этого исследования анти-NPR1 антитела (mAb22033 и mAb22810) ковалентно связывали с N-гидроксисукцинимид (NHS)-агарозными гранулами (GE Lifescience, № по каталогу 17-0906-01) в соответствии с протоколом производителя. Экспрессируемый клетками CHO человеческий рекомбинантный белок NPR1 содержал экто-домен человеческого белка NPR1 (Uniprot, номер доступа P16066) с C-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (SEQ ID NO: 194). Пептид ANP приобретали у TOCRIS (номер по каталогу 1906).

Буфер для дейтерирования готовили в D₂O, содержащей 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄ и 2 мМ KH₂PO₄ (pD=7,4). Для экспериментов в формате "с антигеном" ("antigen-on") или "с комплексом" ("complex-on") 30 мкл суспензии гранул со связанным антителом (эквивалент 15 мкл гранул) смешивали с hNPR1.mmh или комплексом hNPR1.mmh/ANP. Смесь инкубировали при комнатной температуре, бережно вращая. Процесс дейтерирования останавливали вместе с процессом элюции hNPR1.mmh из гранул со связанным антителом, используя 0,075% ледяной TFA. После остановки реакции образец сразу вводили в Waters HDX Manager для расщепления пепсином в режиме потока (online) (колонка с пепсином Waters Enzymate VEN, 2,1×30 мм). Расщепленные пептиды улавливали на предколонке ACQUITY UPLC VEN C18 1,7 мкм, 2,1×5 мм VanGuard при 0°C и элюировали на колонке ACQUITY UPLC VEN C18 1,7 мкм, 2,1×50 мм, используя 8-минутное градиентное разделение 1-30% B (подвижная фаза A: 0,1% муравьиной кислоты в воде, подвижная фаза B: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Масс-спектрометр устанавливали на конусное напряжение 37 В, время сканирования 0,5 с и диапазон отношения масса/заряд 50-1700 Th.

Для картирования связывающего эпитопа hNPR.mmh, распознаваемого mAb22033, выполняли две серии экспериментов по обмену H/D. В первом эксперименте использовали формат "с антигеном" (HDX только антигена с последующим связыванием с гранулами со связанными антителами). Для эксперимента в формате "с антигеном" hNPR1.mmh дейтерировали в течение 3 и 8 мин (в двух отдельных субэкспериментах) в фосфатном буфере, приготовленном в D₂O (PBS-D, pD=7,4), при комнатной температуре. Затем к гранулам mAb22033, промытым PBS-D, добавляли дейтерированный hNPR1.mmh для 2-минутной инкубации при комнатной температуре, в результате чего общее время дейтерирования составило 5 и 10 мин соответственно. Затем связанный hNPR.mmh элюировали с гранул, используя водный 0,075% раствор ледяной трифторуксусной кислоты (TFA). Элюированный hNPR.mmh сразу вводили в систему управления Waters HDX для расщепления пепсином в режиме потока с последующим измерением массы пептида.

Второй эксперимент называется форматом "с комплексом" (HDX гранул с комплексом антиген/антитело). Для этого эксперимента hNPR.mmh сначала связывали с гранулами с mAb22033 в обычном PBS (pH 7,4) в течение 2 мин. Затем комплекс инкубировали в PBS-D (pD=7,4) в течение 5 или 10 мин (в отдельных подэкспериментах) для дейтерирования. Следующие этапы (элюция, инъекция, расщепление пепсином и анализ MS) выполняли, как описано в предыдущей процедуре "с антигеном".

Для идентификации пептидов и выполнения измерений поглощения дейтерия сначала обрабатывали данные LC-MS^E, полученные для недейтерированного hNPR1.mmh, и выполняли поиск в базе данных, включая hNPR1.mmh, с помощью программного обеспечения Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Идентифицированные пептиды импортировали в программное обеспечение DynamX и отфильтровывали по двум критериям: 1) минимальное количество продуктов на аминокислоту: 0,3 и 2) пороговое значение файла репликации: 2. Затем с помощью программного обеспечения DynamX смогли определить поглощение дейтерия каждым пептидом, использованным в экспериментах в форматах "с антигеном" и "с комплексом", на основании времени удерживания каждого пептида и точности массы (<30 ppm) в двух временных точках. Все идентифицированные пептиды проверяли и выполняли скрининг вручную, чтобы свести к минимуму ложноположительные совпадения.

Центроидные значения или среднее значение отношения массы к заряду (m/z) всех обнаруженных пептидов вычисляли и сравнивали между экспериментами "с антигеном" и "с комплексом" в двух временных точках. Пептиды, демонстрирующие повышенную массу после дейтерирования в формате "с антигеном" по сравнению с дейтерированием в формате "с комплексом", включают аминокислоты, защищенные от обмена дейтерия в результате связывания с антителом и, следовательно, позволяют выявить участки связывания эпитопа.

В HDX эксперименте с NPR1/mAb22033 был идентифицирован всего 101 пептид из hNPR1.mmh, что составляет 74% покрытия последовательности. Среди этих пептидов десять пептидов, охватывающих аминокислоты 29-50 и 328-347, имели значительно увеличенную массу после дейтерирования в формате "с антигеном" по сравнению с дейтерированием в формате "с комплексом", как показано в табл. 46.

Таблица 46

Влияние на обмен Н/D связывания mAb22033 с hNPR1.mmh, измеренное с помощью значений MH^+ пептидов после расщепления пепсином

NPR1- mmH остатки	5 мин дейтерирование			10 мин дейтерирование		
	С антигеном	С комплексом	Δ	С антигеном	С комплексом	Δ
29-50	2426,346	2424,541	1,80	2426,649	2424,925	1,72
32-50	2128,200	2126,776	1,42	2128,488	2127,088	1,40
46-54	950,481	950,333	0,15	950,549	950,527	0,02
328-335	925,039	925,027	0,01	925,065	925,030	0,03
328-347	2084,447	2081,863	2,58	2084,306	2081,925	2,38
329-347	1921,240	1918,335	2,91	1921,305	1918,614	2,69
331-347	1679,173	1677,107	2,07	1679,106	1677,176	1,93
332-347	1607,797	1605,754	2,04	1607,799	1605,842	1,96
334-347	1407,379	1405,529	1,85	1407,335	1405,612	1,72
335-347	1278,196	1276,411	1,78	1278,225	1276,463	1,76
336-347	1176,174	1174,913	1,26	1176,181	1174,926	1,26
337-347	1063,079	1061,760	1,32	1063,014	1061,745	1,27

Поскольку два пептида, аминокислоты 46-54 и 328-335, не показали разницы в поглощении дейтерия между процедурами "с антигеном" и "с комплексом", области, защищенные от обмена дейтерия, у пептидов 29-50 и 328-347 уменьшаются до остатков 29-45 и 336-347. Следовательно, два сегмента, включающая аминокислоты 29-45 и 336-347, идентифицированы как эпитоп для связывания антитела mAb22033 с белком hNPR1.mmh.

Для HDX эксперимента с NPR1/ANP/mAb22033 было идентифицировано всего 95 пептидов из hNPR.mmh, что составляет 68% покрытия последовательности. Среди этих пептидов девять пептидов, охватывающих аминокислоты 29-50 и 331-347, имели значительно увеличенную массу после дейтерирования в формате "с антигеном" по сравнению с дейтерированием в формате "с комплексом", как показано в табл. 47.

Таблица 47

Влияние на обмен Н/D связывания mAb22033 с hNPR1.mmh/ANP, измеренное с помощью значений MH^+ пептидов после расщепления пепсином

NPR1- mmH остатки	5 мин дейтерирование			10 мин дейтерирование		
	С антигеном	С комплексом	Δ	С антигеном	С комплексом	Δ
29-50	2425,746	2424,277	1,47	2426,686	2425,079	1,61
32-50	2127,514	2126,429	1,08	2128,333	2127,126	1,21
35-50	1828,391	1827,331	1,06	1829,026	1827,974	1,05
46-54	950,149	950,080	0,07	950,312	950,323	-0,01
331-347	1679,030	1677,150	1,88	1679,016	1677,216	1,80
332-347	1607,700	1605,825	1,88	1607,738	1605,943	1,79
334-347	1407,282	1405,558	1,72	1407,271	1405,715	1,56
335-347	1278,028	1276,463	1,56	1278,087	1276,658	1,43
336-347	1176,211	1175,009	1,20	1176,186	1175,009	1,18
337-347	1063,036	1061,743	1,29	1063,019	1061,807	1,21

Поскольку другой пептид, аминокислоты 46-54, не показал разницы в поглощении дейтерия между процедурами "с антигеном" и "с комплексом", область, защищенная от обмена дейтерия, в пептиде 29-50 уменьшается до остатков 29-45. Таким образом, два сегмента, включающая аминокислоты 29-45 и 331-347, идентифицированы как эпитоп для связывания антитела mAb22033 с белковым комплексом hNPR1.mmh/ANP.

Для HDX эксперимента с NPR1/ANP/mAb22810 было идентифицировано всего 93 пептида из hNPR.mmh, что составляет 70% покрытия последовательности. Среди этих пептидов десять пептидов, охватывающих аминокислоты 29-50, 70-81 и 331-347, имели значительно увеличенную массу после дей-

терирования в формате "с антигеном" по сравнению с дейтерированием в формате "с комплексом", как показано в табл. 48.

Таблица 48
Влияние на обмен H/D связывания mAb22810 с hNPR1.mmh/ANP,
измеренное с помощью значений МН⁺ пептидов после
расщепления пепсином

NPR1-mmH остатки	5 мин дейтерирование			10 мин дейтерирование		
	С антигеном	С комплексом	Δ	С антигеном	С комплексом	Δ
29-50	2426,295	2425,324	0,97	2426,927	2426,077	0,85
32-50	2128,086	2127,361	0,72	2128,584	2128,016	0,57
33-50	2056,507	2056,083	0,42	2056,723	2056,405	0,32
35-50	1828,973	1828,597	0,38	1829,278	1828,952	0,33
46-54	950,063	950,090	-0,03	950,267	950,087	0,18
70-81	1456,036	1455,661	0,37	1456,127	1455,699	0,43
72-81	1241,898	1241,496	0,40	1241,969	1241,536	0,43
331-347	1678,712	1678,316	0,40	1678,888	1678,589	0,30
332-347	1607,457	1607,060	0,40	1607,617	1607,323	0,29
334-347	1407,018	1406,698	0,32	1407,217	1406,970	0,25
335-347	1277,816	1277,550	0,27	1278,075	1277,824	0,25
336-347	1175,926	1175,894	0,03	1176,094	1176,051	0,04
337-347	1062,703	1062,646	0,06	1062,844	1062,767	0,08

Поскольку три пептида, аминокислоты 46-54, 336-347, 337-347, не показали разницы в захвате дейтерия между процедурами "с антигеном" и "с комплексом", области, защищенные от обмена дейтерия, в пептидах 29-50 и 331-347 уменьшаются до остатков 29-45 и 331-335. Таким образом, три сегмента, включая аминокислоты 29-45, 70-81 и 331-335, идентифицированы как эпитоп для связывания антитела mAb22810 с белковым комплексом hNPR1.mmh/ANP.

Пример 13. Интравитреальная инъекция анти-NPR1 антитела гуманизированным мышам NPR1 снижает внутриглазное давление.

В этом примере описано влияние интравитреальной инъекции (IVT) иллюстративного антитела к человеческому NPR1 mAb22033 на внутриглазное давление (IOP) у мышей, экспрессирующих гуманизированный NPR1.

Методы: NPR1-гуманизированных мышей (NPR1^{hu/hu}) получали с помощью технологии VelociGene (Regeneron). Одну IVT инъекцию 40 мкг mAb22033 или контрольного Ab вводили NPR1-гуманизированным мышам или мышам дикого типа (WT). IOP измеряли ежедневно в течение четырех дней после инъекции. Во втором эксперименте для изучения реакции на дозу интравитреально вводили 40, 12,6 или 4 мкг mAb22033 или 40 мкг контрольного Ab и ежедневно контролировали IOP. В другом эксперименте, чтобы проверить влияние Ab с длительной доставкой, вводили векторы AAV2, экспрессирующие антитело к NPR1 или eGFP, IOP наблюдали в течение 7 недель.

Результаты: IVT 40 мкг mAb22033 мышам NPR1^{hu/hu} значительно снижало IOP с 1 по 3 день по сравнению с контрольным антителом. Среднее изменение IOP составило 5 мм рт. ст. Однако у мышей WT не наблюдали эффекта снижения IOP. Исследование "доза-ответ" показало, что введенные внутривенно дозы 40 или 12,6 мкг mAb22033 имели аналогичный эффект снижения IOP, при этом эффект 40 мкг mAb22033 длился дольше, чем 12,6 мкг. IVT 4 мкг антитела NPR1 не снижало IOP. После IVT антител AAV2-GFP или AAV2-NPR1 во все протестированные моменты времени не наблюдали эффекта IOP. Это могло быть связано с низкой экспрессией антитела NPR1, т.е. было обнаружено только 10 нг во всем лизате, полученном из глаза.

Заключение: IVT-введение человеческого анти-NPR1 антитела (mAb22033) NPR1-гуманизированным мышам значительно снижало IOP, тем самым демонстрируя потенциал антител-агонистов NPR1 в отношении снижения IOP при глаукоме.

Пример 14. Структурный анализ комплекса антитело-NPR1 с помощью электронной микроскопии.

Методы.

Титрование с помощью эксклюзионной хроматографии с детектором многоуглового светорассеяния (SEC-MALS).

Выполняли несколько серий титрования внеклеточного домена человеческого NPR1 с C-концевой тус-тус-6xHis меткой (hNPR1-mmh; SEQ ID NO: 194) в комплексе с различными антителами в различных молярных соотношениях. Тестировали следующие антитела: mAb22033, REGN5308 (Fab-фрагмент mAb22033), mAb22810 и REGN5314 (Fab-фрагмент mAb22810). Все серии титрования выполняли как с

использованием предсердного натрийуретического фактора (ANP, Tocris), так и без него при 2-кратном молярном избытке по сравнению с hNPR1-mmh. После инкубации в течение ночи в PBS при 4°C комплексы вводили в систему SEC-MALS, которая состояла из колонки Superdex 200 Increase 10/300 G1 на микросистеме ÄKTA (GE Healthcare Life Sciences), а затем в систему miniDAWN Treos и Optilab T-rEX (Wyatt Technology Corporation). Поскольку фосфатные буферы несовместимы с отрицательным окрашиванием для электронной микроскопии, колонку SEC уравнивали в 50 mM Трис pH 7,5, 150 mM рабочем буфере NaCl, и все более крупномасштабные комплексы, полученные ниже, находились в этом буфере. Данные эксклюзионной хроматографии оценивали с помощью Unicorn (версия 5.20, General Electric Company), а данные MALS оценивали с помощью ASTRA (версия 7.0.0.69 Wyatt Technology).

Подготовка проб для электронной микроскопии с отрицательным пятном.

Комплексы hNPR1 готовили в более крупном масштабе для использования в электронной микроскопии с отрицательным пятном. Пять образцов получали следующим образом: образец 1 = только hNPR1-mmh (SEQ ID NO: 194); образец 2 = только hNPR1-Fc (SEQ ID NO: 197); образец 3 = hNPR1-mmh+ANP, молярное соотношение 1:2; образец 4 = hNPR1-mmh+REGN5308, молярное соотношение 1:1,5; образец 5=hNPR1-mmh+ANP+REGN5308, молярное соотношение 1:2:1,5. Образцы 1, 3, 4 и 5 очищали эксклюзионной хроматографией таким же образом, как в экспериментах SEC-MALS. Пиковые фракции собирали, замораживали при -80°C и отправляли в NanoImaging Services, Inc. для EM анализа. Образец 2 брали непосредственно из исходного раствора 2,62 мг/мл в PBS, буфер заменяли на 50 mM Трис, pH 7,5+150 mM NaCl, разбавляли до 1,5 мг/мл, замораживали при -80°C и отправляли с другими образцами.

Сбор и обработка данных электронной микроскопии с отрицательным пятном.

Для пяти образцов белка получали EM-сетки отрицательного пятна стандартным способом с использованием уранилформиата (NanoImaging Services). Сетки содержали тонкий сплошной слой углерода, помещенный поверх углеродной сетки с отверстиями в форме буквы С. Изображения TEM получали при комнатной температуре на электронном микроскопе Tecnai T12 (FEI/Thermo Fisher), работающем при 120 кэВ, с камерой FEI Eagle 4k × 4k CCD. Изображения собирали при различных номинальных увеличениях, в основном 67000× и 110000×. Собранные изображения дополнительно обрабатывали собственными силами.

Микрофотографии NanoImaging проверяли на глаз, и изображения, которые имели плохой контраст пятна, удаляли, примерно 1/5 от общего числа изображений. Остальные изображения разделяли, используя увеличение; изображения размером 110000× не были столь полезны для дальнейшего анализа, поскольку в каждом изображении было меньше частиц. Следовательно, все последующие этапы обработки выполняли, используя изображения 67000×. Все изображения были CTF-скорректированными с помощью CTFIND4.

Выявление EM частиц и усреднение 2D-класса.

Распределение частиц для всех пяти образцов с отрицательными пятнами было довольно хорошим, с однородным размером частиц, очень небольшим слипанием и хорошей плотностью частиц. В образцах 4 и 5 частицы выявляли с помощью Relion с шаблонами автозапуска, полученными из начального раунда ручного сбора и усреднения 2D-класса. Для образца 4 (hNPR1+REGN5308) было выявлено 19184 хороших частиц в общей сложности из 75 микрофотографий. Для образца 5 (hNPR1+ANP+REGN5308) изначально было выявлено 20318 хороших частиц в общей сложности из 88 микрофотографий. Начальное усреднение 2D-класса с помощью Relion выявило существенную неоднородность в обоих наборах данных с существенным количеством классов, показывающих только Fab REGN5308 или только NPR1.

Усреднение 2D-класса для образца 5 дополнительно уточняли путем удаления частиц, соответствующих только Fab или только NPR1. Оставшиеся 9219 частиц использовали для расчета новых средних значений 2D-класса, которые показали лучшее распределение изображений для комплекса NPR1+REGN5308 и показали, что меньшая часть комплексов содержит только один Fab, связанный с димером NPR1, в то время как большинство комплексов содержат два Fab. Удаление комплексов один-Fab дополнительно уменьшило набор частиц до 6728 частиц.

Реконструкция трехмерного изображения по данным EM отрицательного пятна.

Первоначальную трехмерную модель комплекса NPR1-ANP-REGN5308 строили в Relion с помощью процедуры стохастического градиентного спуска для "начальной 3D модели" с разрешением, ограниченным 40 Å. Затем эту модель фильтровали по нижним частотам до 60 Å и использовали в качестве эталона для 3D классификации в Relion для 6728 частиц, упомянутых выше, с разрешением шага ожидания, ограниченным до 25 Å. Затем лучший 3D-класс дополнительно уточняли в Relion до сходимости с конечным разрешением 22 Å, измеренным "золотым стандартом" FSC. Во время 3D-классификации или уточнения 2-кратная симметрия не применялась. Карта плотности, полученная в результате трехмерной реконструкции, ясно показала, что два Fab-фрагмента, связанные с одной стороной квадратной частицы, соответствуют кристаллической структуре ANP-связанного NPR1 (код PDB 1T34).

Подготовка проб и сбор данных для криоэлектронной микроскопии.

Образец комплекса NPR1-ANP-REGN5308 готовили для криоэлектронной микроскопии (CryoEM) таким же образом, как образец для отрицательного пятна EM, описанный выше. Конечная концентрация комплекса составляла 0,8 мг/мл в 50 mM Трис, pH 7,5, 150 mM NaCl. Образцы CryoEM готовили стандартными методами с использованием сеток UltrAuFoil (Quantifoil Micro Tools GmbH) и Vitrobot (FEI/Thermo Fisher). Сбор данных выполняли на электронном микроскопе Titan Krios, работающем при 300 кВ (FEI/Thermo Fisher), с использованием прямого электронного детектора K2 в режиме подсчета и энергетического фильтра GIF (Gatan, Inc.). Было собрано 1409 фильмов с увеличением 130000× (1,04 Å/пиксель) с диапазоном расфокусировки от -0,5 до -1,5 мкм и общей дозой 45,44 э⁻/Å². Сбор данных контролировали с помощью программы Legion.

Обработка данных CryoEM и определение структуры.

Все фильмы CryoEM корректировали по движению, взвешивали по дозе и корректировали CTF с помощью пакета cisTEM. Затем изображения проверяли вручную, удаляя те, которые имеют толстый лед, плохие параметры CTF (разрешение подгонки хуже 6 Å), отсутствие частиц, загрязнение и т.д. После такой фильтрации осталось 1172 изображения, которые затем использовали для сбора частиц без шаблона в cisTEM, что дало 872915 позиций частиц. После двухмерной классификации с удалением плохих частиц для трехмерного автоматического уточнения с помощью cisTEM было включено 686709 частиц, при этом ab initio был сгенерирован начальный 3D эталонный объем. Трехмерное уточнение сошло к одному решению с разрешением 2,8 Å, оцененным по кривой корреляции Фурье-оболочки.

Затем эту 3D карту использовали для уточнения структуры, начиная с модели, встроенной в 3D карту отрицательного пятна EM, упомянутую выше. N- и C-концевые домены обеих молекул NPR1 уточняли в реальном пространстве как твердые тела в EM-карте и затем вручную перестраивали в тех немногих местах, где модель не соответствовала плотности EM. Модель гомологии REGN5308 вручную помещали в EM-плотность; тщательная проверка участков CDR позволила определить ориентацию тяжелой и легкой цепей. Области CDR модели нуждались в обширной перестройке для приведения в соответствие EM-плотности. Наконец, позиционное уточнение в реальном пространстве с помощью Phenix позволило получить текущую структурную модель комплекса.

Результаты/обсуждение.

Титрование с помощью эксклюзионной хроматографии с детектором многоуглового светорассеяния (SEC-MALS).

При взаимодействии hNPR1-mmh с mAb22033, hNPR1-mmh сам по себе ведет себя как димер с молекулярной массой приблизительно 110 кДа в присутствии и в отсутствие ANP с небольшим увеличением молекулярной массы при связывании ANP с NPR1. Для самого hNPR1-mmh не наблюдали пика свободного мономера. Титрование mAb22033 в отсутствие ANP выявило два основных вида комплекса: вид с молекулярной массой, равной одному IgG, связанному с одним димером NPR1, и вид с молекулярной массой, равной одному IgG, связанному с двумя димерами NPR1. Однако NPR1 плюс mAb22033 в присутствии ANP образовывали частицы с более высокой молекулярной массой, которые могли представлять собой полимеры NPR1 и IgG типа "бумажная кукла".

Впоследствии система была упрощена путем рассмотрения REGN5308, Fab-фрагмента mAb22033. Комплексы hNPR1-mmh и REGN5308 показывают совершенно другой профиль SEC со связанным ANP по сравнению с теми же комплексами без ANP. Комплекс NPR1-REGN5308 имеет молекулярную массу приблизительно 155 кДа, что соответствует одному связанному Fab на димер NPR1. В присутствии ANP молекулярная масса комплекса NPR1-ANP-REGN5308 увеличивается на ~50 кДа, что соответствует двум связанным Fab на димер NPR1. Было выдвинуто предположение, что ранее описанное конформационное изменение NPR1 при связывании с ANP (Ogawa, H. et al., 2004) позволяет связываться второму Fab и что комплекс 2 Fab+2 NPR1+ANP необходим для роста полимеров "бумажная кукла", наблюдаемых с полно-размерным IgG mAb22033 (дальнейшее обсуждение см. ниже).

Также проводили титрование с hNPR1-mmh и mAb22810. Анализ SEC-MALS показал, что небольшая фракция образца mAb22810 была димерной с молекулярной массой приблизительно 315 кДа по сравнению со стандартной молекулярной массой IgG 150 кДа. Титрование SEC-MALS с комплексом NPR1-mAb22810-ANP показало гетерогенную смесь видов в диапазоне 430-700 кДа; этот профиль был слишком сложным, чтобы его можно было надежно интерпретировать, возможно, из-за примеси димера IgG в белке mAb22810. Титрование SEC-MALS с REGN5314, Fab-фрагментом mAb22810, показало, что связывание REGN5314 с NPR1 в отсутствие ANP является слишком слабым или временным для получения сложных видов, которые можно выделить с помощью SEC. Когда присутствует ANP, образуется единственный комплекс NPR1-REGN5314-ANP с молекулярной массой приблизительно 170 кДа, что соответствует одному связанному Fab на димер NPR1.

Средние значения 2D-класса отрицательных пятен.

Комплексы hNPR1+REGN5308 и hNPR1+ANP+REGN5308 дополнительно анализировали с помощью электронной микроскопии с отрицательным пятном. 2D классификация и усреднение сложных частиц выявили существенную неоднородность образцов. Большая часть частиц на решетках EM может быть классифицирована только как hNPR1 или только как REGN5308 Fab. Поскольку образцы белка,

представленные для визуализации, были очищенными гомогенными комплексами, похоже, что эти комплексы диссоциируют на свои компоненты в процессе подготовки сетки отрицательного пятна. Однако значительная часть комплексов осталась нетронутой и может быть использована для анализа.

Средние значения 2D-класса отрицательного пятна для hNPR1+REGN5308 показывают "одноплечевой" комплекс, в котором можно увидеть связывание только одного Fab-фрагмента с димером hNPR1, что согласуется с результатами SEC-MALS. Напротив, средние значения 2D-класса отрицательного пятна для hNPR1+ANP+REGN5308 показывают "двухплечевой" комплекс, с двумя Fab, связанными с димером. Разные средние значения представляют разные проекции реального трехмерного комплекса. В среднем по одному классу, димер hNPR1 виден на виде сбоку с двумя долями плотности: одна соответствует N-концевым доменам двух мономеров, наложенных друг на друга, а другая доля соответствует двум наложенным друг на друга C-концевым доменам. В этой ориентации два связанных Fab выглядят как "кроличьи уши", расположенные поверх плотности NPR1. С другой стороны, все четыре домена hNPR1 можно рассматривать как четыре плотных пятна, образующих квадрат, причем два Fab REGN5308 над квадратом пересекаются друг с другом, образуя перевернутый V. Средние значения класса hNPR1+ANP+REGN5308 также показали "одноплечевые" комплексы, но они, вероятно, связаны с той же диссоциацией комплекса, которая дает свободный Fab и свободный NPR1.

Средние значения 2D класса, рассчитанные из данных CryoEM для hNPR1+ANP+REGN5308, показывают другие виды комплекса по сравнению с данными отрицательного пятна; в частности, нет ориентации "заячьи уши". Однако другие средние значения 2D класса данных CryoEM могут быть точно сопоставлены с соответствующими средними значениями в данных отрицательного пятна. Не было получено достаточного количества доказательств диссоциации комплекса в данных CryoEM, вероятно, потому что исходный образец был более однородным, а также потому, что условия криозаморозки лучше сохраняют нативную конформацию комплекса в растворе.

Реконструкция 3D изображения.

Трехмерную карту плотности CryoEM для hNPR1+ANP+REGN5308 строили с помощью средних значений 2D-класса в качестве отправной точки. Эта процедура реконструкции не требует какой-либо предварительной информации об ожидаемой форме или размере комплекса, кроме грубой оценки диаметра комплекса, поэтому полученная CryoEM карта не зависит от ожиданий исследователей относительно того, как должен формироваться комплекс антигено-мишень. Затем помещали известную кристаллическую структуру hNPR1+ANP и уточняли в этой карте EM-плотности вместе с моделями Fab REGN5308, созданными путем гомологии с известными структурами Fab. Структуры NPR1 и Fab помещали в свои приблизительные места вручную и затем уточняли в виде твердых тел в правильных местах с помощью Phenix. Разрешение CryoEM карт является достаточным для перестройки остатков вручную на границе контакта NPR1:антигено, особенно остатков в определяющих комплементарность областях (CDR) REGN5308, которые не могут быть точно смоделированы с помощью гомологии. Текущая структурная модель содержала все остатки CDR антигена, а также остатки NPR1 в контакте с ними. Более удаленные области модели (C-концевые домены NPR1 и константные Fab-домены антигена) были смоделированы с помощью комбинации текущей CryoEM карты и ранее определенной информации о кристаллической структуре, полученной с помощью рентгеноструктурного анализа, для NPR1 (код PDB 1T34) и структуры выделенных антигенов.

Эпитоп mAb22033 на NPR1:проверка структуры hNPR1+ANP+REGN5308 показывает, с какими остатками NPR1 связывается Fab REGN5308 (и, соответственно, родительское IgG mAb22033). Этот эпитоп состоит из четырех отдельных участков аминокислот в NPR1, которые объединены, образуя непрерывную поверхность в трех измерениях: остатки 2-4, 41-45, 47, 73-79, 332, 336-344 и 347 (пронумерованы согласно SEQ ID NO: 194). В результате более ранних масс-спектрометрических экспериментов с обменом водород/дейтерий (HDX) некоторые из этих остатков были идентифицированы как значимые (см. пример 12), но CryoEM структура обеспечивает более тонкую детализацию эпитопа.

Структурный механизм действия mAb22033.

Два Fab в этой модели комплекса NPR1-антигено находятся в пределах ~ 10 Å друг от друга в точке около "изгиба" между переменными доменами Fab и константными доменами Fab. C-концы этих двух Fab-фрагментов находятся намного дальше друг от друга, примерно на 100 Å, и поэтому не могут быть двумя плечами одной молекулы IgG. Fab-фрагменты не подходят достаточно близко к смоделированному пептиду ANP (расстояние примерно 30 Å при самом близком приближении), и не похоже, что существует какое-либо прямое взаимодействие между Fab и ANP.

Исходя из предположения фиксированного положения и относительной ориентации Fab относительно его сайта связывания в N-концевом домене NPR1, возникает объяснение ANP-зависимого связывания Fab REGN5308. Было показано, что NPR1 претерпевает конформационное изменение при связывании с ANP, при котором один мономер NPR1 вращается относительно другого, оставаясь димеризованным. Применяя этот поворот к одной половине комплекса 2 NPR1+2 Fab, получаем модель, в которой димер NPR1 напоминает кристаллическую структуру NPR1 без ANP. Однако один из Fab REGN5308 теперь повернут в положение, в котором он стерически конфликтует с другим Fab, что является физически невозможной ситуацией. Эта стерическая помеха является причиной того, почему только один Fab

REGN5308 может связываться с димером NPR1 в отсутствие ANP: оба сайта связывания антител на двух мономерах являются одинаково доступными, но связывание первого Fab блокирует связывание второго Fab.

При рассмотрении этого эффекта с другой стороны, связывание двух Fab с ANP-содержащим димером NPR1 будет препятствовать релаксации этого комплекса обратно к конформации, свободной от ANP, до тех пор, пока оба Fab связаны. В состоянии равновесия это может привести к тому, что большая часть молекул NPR1 будет находиться в активном состоянии, способном передавать сигналы ниже - если исходить из предположения, что наблюдаемые в этом случае эффекты сохраняются на поверхности клетки. Другой возможный эффект связывания антитела - образование олигомерных кластеров антитела с NPR1+ANP, как описано выше. Этот эффект возможен только в том случае, если каждый димер NPR1 может связывать два плеча Fab из двух отдельных молекул IgG; в отсутствие ANP только одно плечо Fab может связываться с каждым димером NPR1, и образование комплекса прекращается с получением гораздо менее крупных соединений, содержащих не более одного IgG с димером NPR1, связанным с каждым плечом Fab. Оба этих эффекта, кластеризация рецепторов и продление активного состояния рецептора, могут объяснить активирующее действие mAb22033 на рецептор NPR1.

Настоящее изобретение не ограничено объемом конкретных вариантов осуществления, раскрытых в настоящем описании. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к раскрытым в настоящем описании станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и прилагаемых фигур. Следует иметь в виду, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком-рецептором натрийуретического пептида 1 (NPR1), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDR) (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее:

- (a) HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4;
- (b) HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6;
- (c) HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8;
- (d) LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12;
- (e) LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14 и
- (f) LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2/10.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с одной или более аминокислотами, содержащимися во внеклеточном домене NPR1 (аминокислоты 29-347 SEQ ID NO: 194), определенными с помощью обмена водород/дейтерий, и причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (i) связывается с клетками, экспрессирующими человеческий NPR1, в присутствии или в отсутствие предсердного натрийуретического пептида (ANP); и/или (ii) активирует NPR1.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из:

- (a) аминокислот 29-45 SEQ ID NO: 194 и
- (b) аминокислот 336-347 SEQ ID NO: 194.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из:

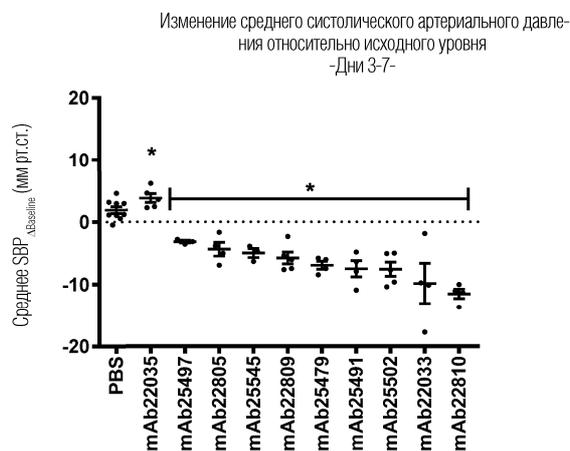
- (a) аминокислот 29-45 SEQ ID NO: 194 и
 - (b) аминокислот 331-347 SEQ ID NO: 194,
- в присутствии ANP.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело является полностью человеческим моноклональным антителом.

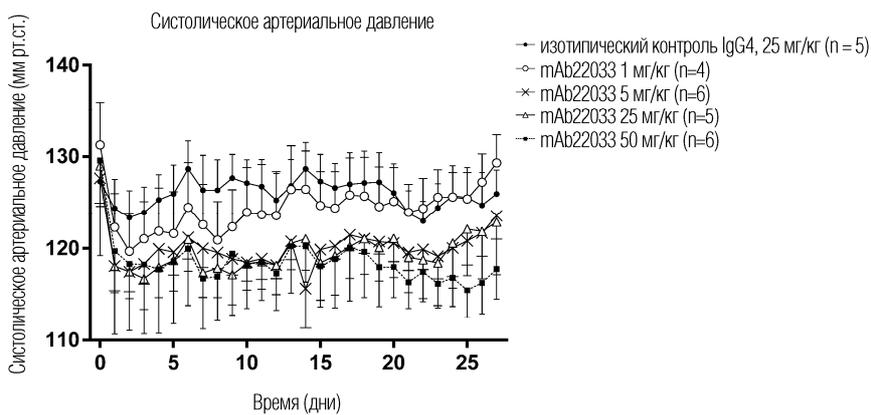
10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, которое имеет одно или более свойств, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) является полностью человеческим моноклональным антителом;
- (b) связывается с мономерным человеческим NPR1 в отсутствие ANP и/или мозгового натрийуретического пептида (BNP) при 25 и при 37°C с константой диссоциации (K_D) менее 690 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса;
- (c) связывается с димерным человеческим NPR1 в отсутствие ANP или BNP при 25 и при 37°C с K_D менее 42 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса;
- (d) связывается с человеческим NPR1 в комплексе с ANP при 25 и 37°C с K_D менее 80 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса;
- (e) связывается с человеческим NPR1 в комплексе с BNP при 25 и 37°C с K_D менее 20 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса;
- (f) связывается с мономерным NPR1 обезьяны в отсутствие ANP и/или BNP при 25 и 37°C с K_D менее 365 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса;
- (g) связывается с димерным NPR1 обезьяны в отсутствие ANP или BNP при 25 и при 37°C с K_D менее 30 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса;
- (h) связывается с NPR1 обезьяны в комплексе с ANP при 25 и 37°C с K_D менее 10 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса;
- (i) связывается с NPR1 обезьяны в комплексе с BNP при 25 и 37°C с K_D менее 10 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса;
- (j) не связывается с мышинным NPR1;
- (k) связывается с клетками, экспрессирующими человеческий NPR1 (без ANP), или комплексом NPR1 с ANP с EC_{50} менее 5 нМ;
- (l) активирует NPR1 с EC_{50} менее 385 нМ, измеренной в биоанализе на основе клеточного потока кальция;
- (m) снижает системное артериальное давление при введении нормотензивным и гипертензивным мышам, причем снижение системного и среднего артериального давления длится до 28 дней после введения одной дозы; и
- (n) улучшает толерантность к глюкозе при введении мышам с ожирением, вызванным диетой.

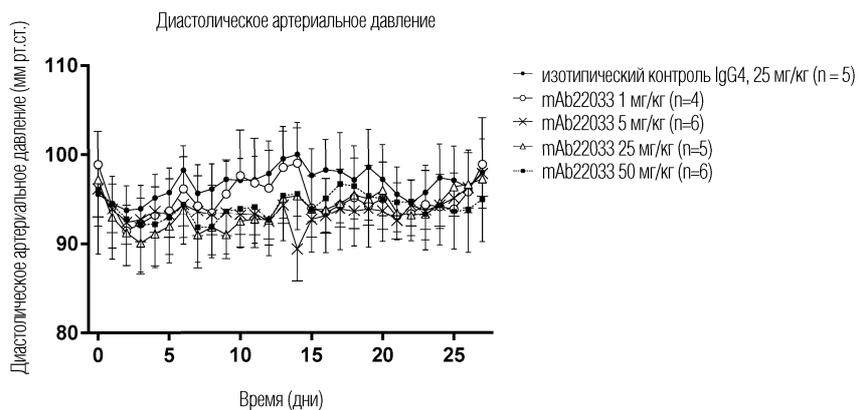
11. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с белком-рецептором натрийуретического пептида 1 (NPR1) по п.1, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.



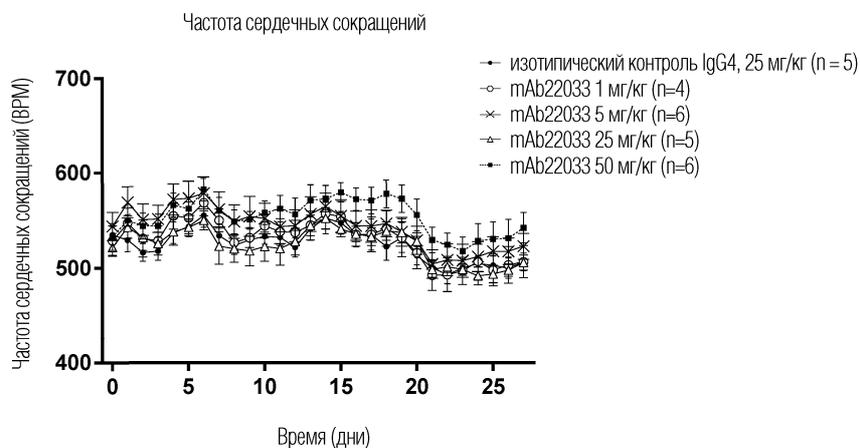
Фиг. 1



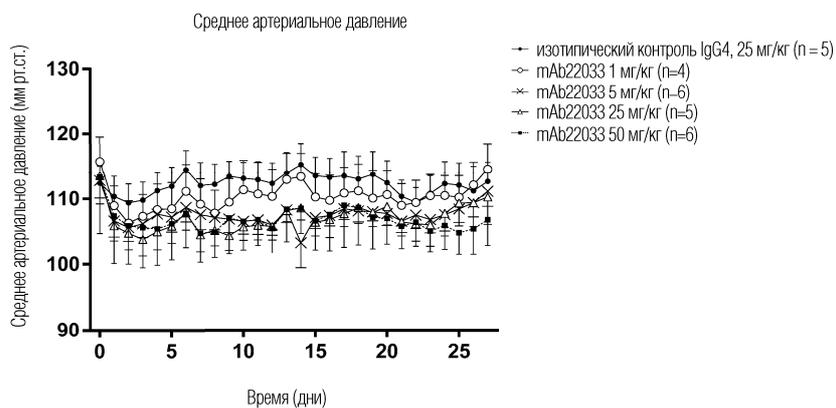
Фиг. 2



Фиг. 3

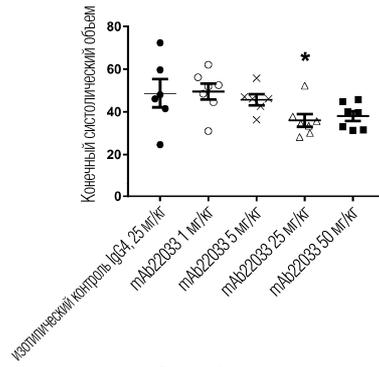


Фиг. 4

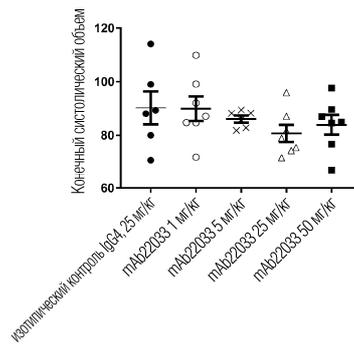


Фиг. 5

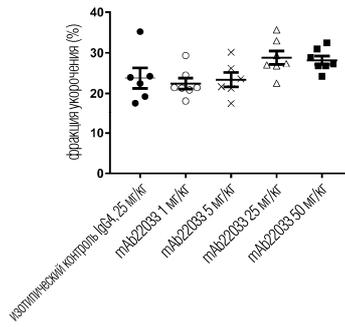
046104



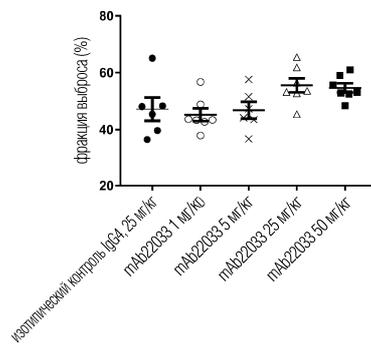
Фиг. 6А



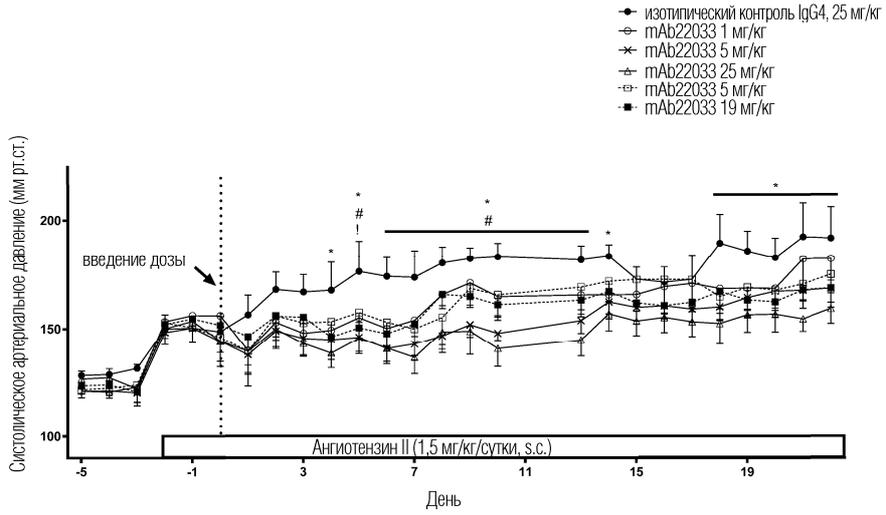
Фиг. 6В



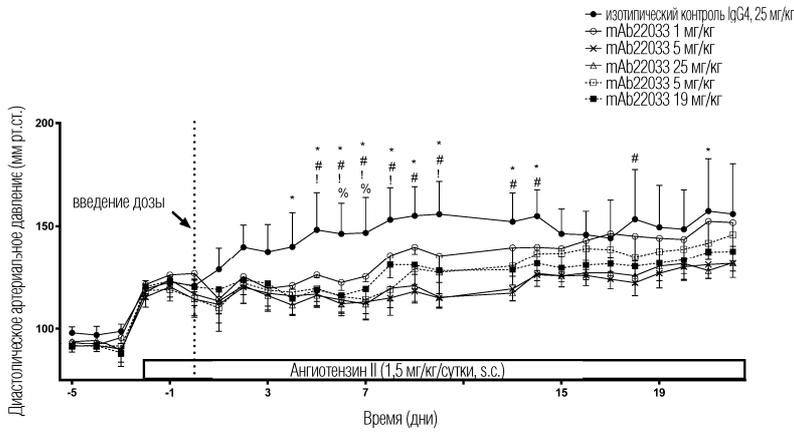
Фиг. 7А



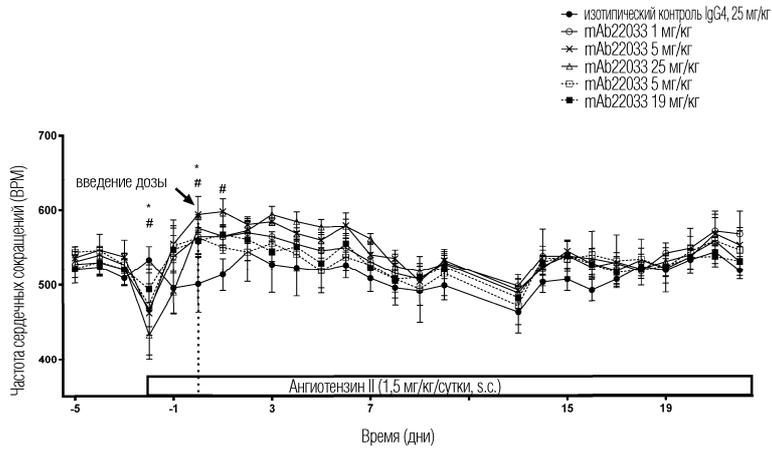
Фиг. 7В



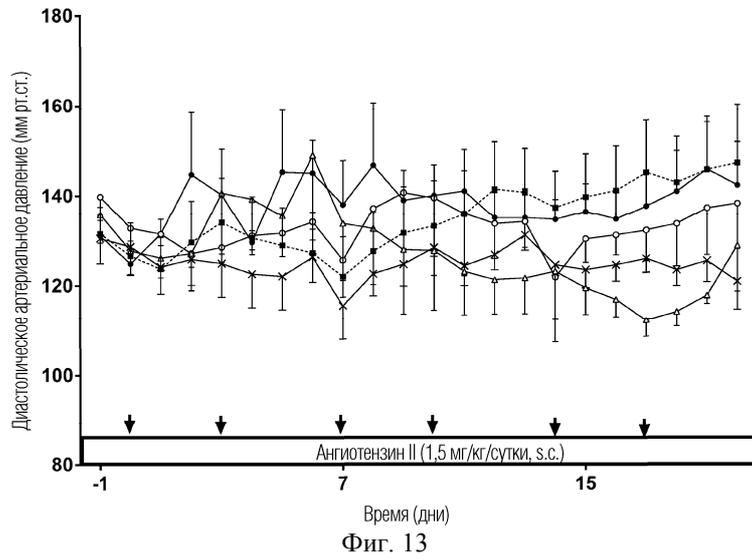
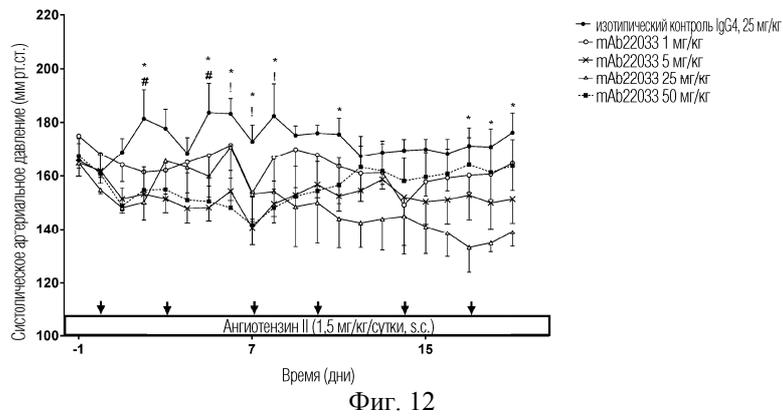
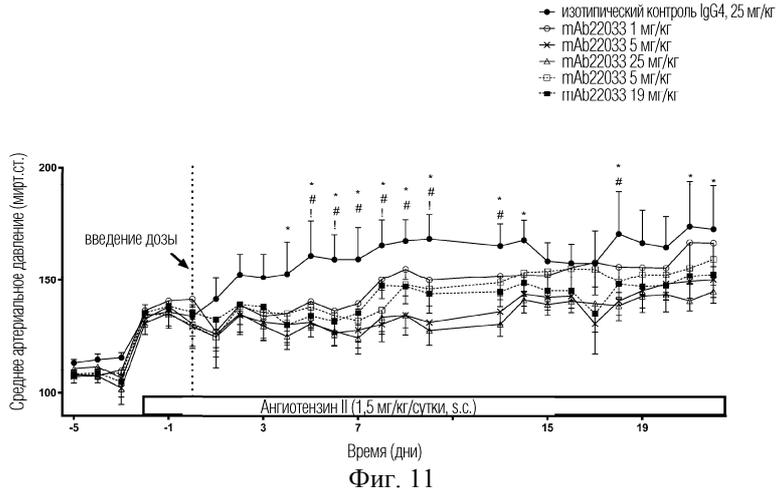
Фиг. 8

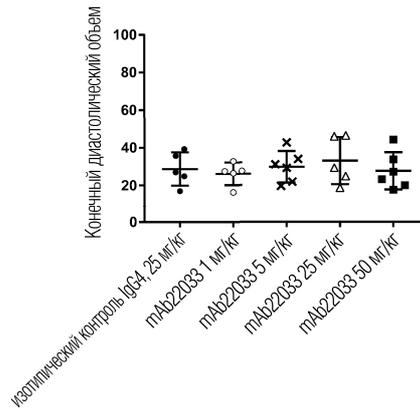
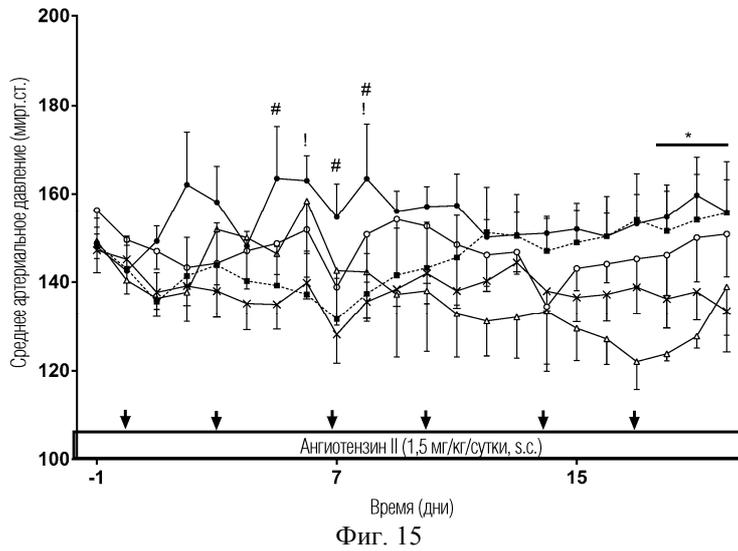
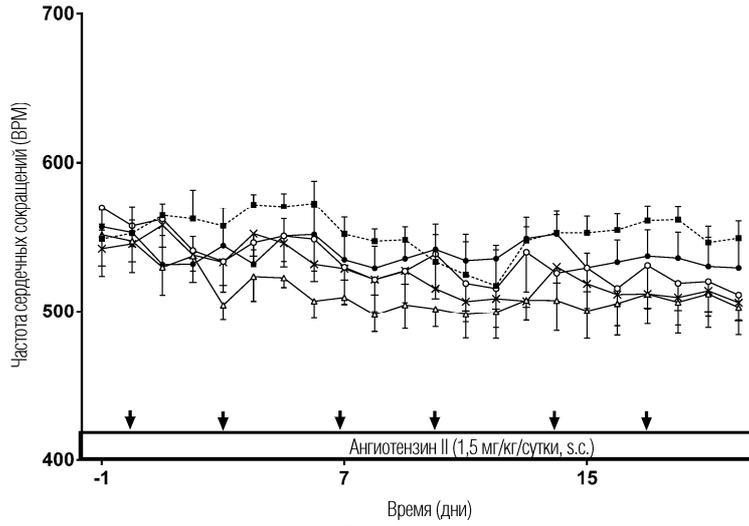


Фиг. 9

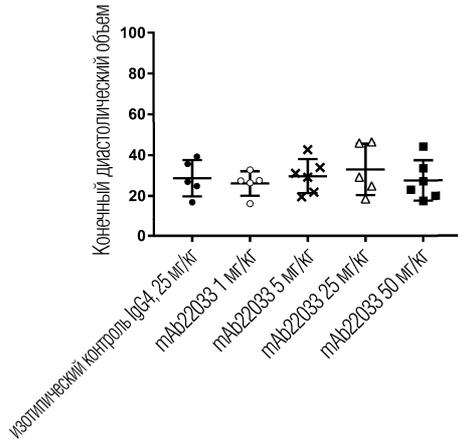


Фиг. 10

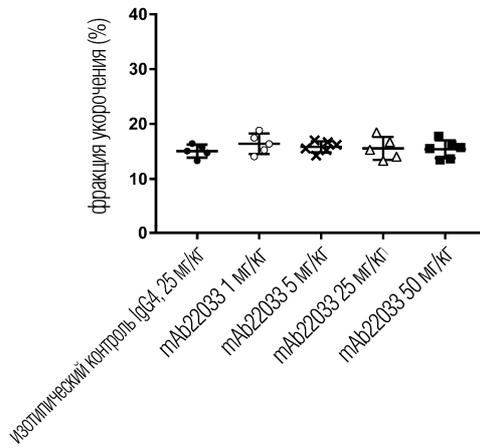




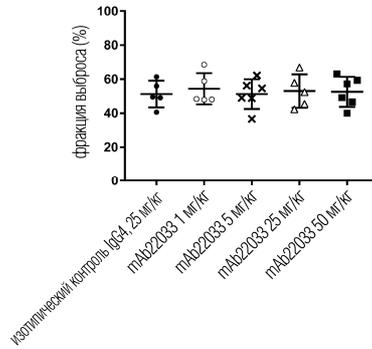
046104



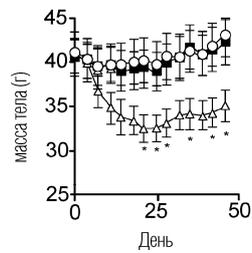
Фиг. 16В



Фиг. 17А



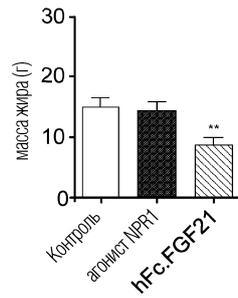
Фиг. 17В



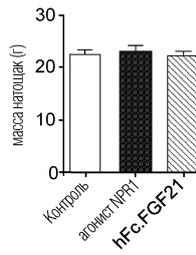
- — Контроль
- — mAb22810 (агонист NPR1)
- △ — hFc.FGF21

Фиг. 18А

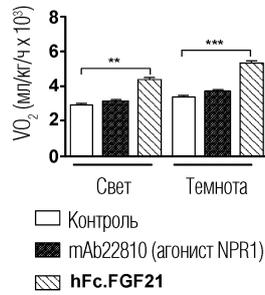
046104



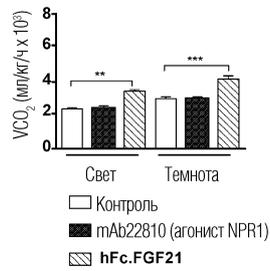
Фиг. 18В



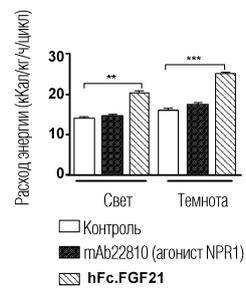
Фиг. 18С



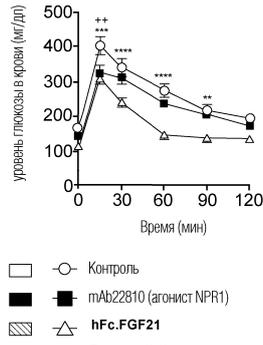
Фиг. 19А



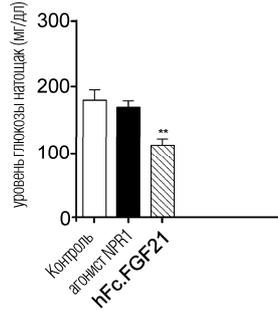
Фиг. 19В



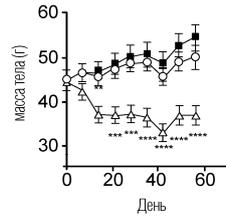
Фиг. 19С



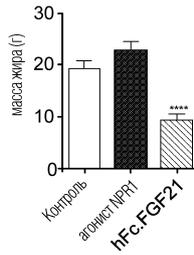
Фиг. 20А



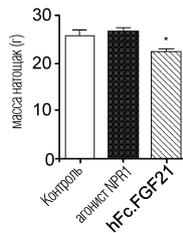
Фиг. 20В



Фиг. 21А

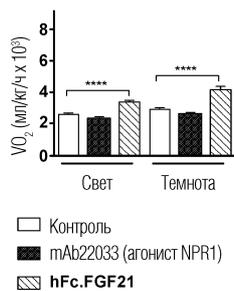


Фиг. 21В

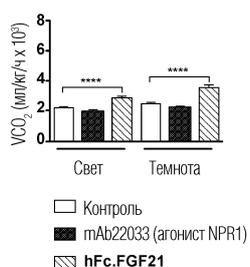


Фиг. 21С

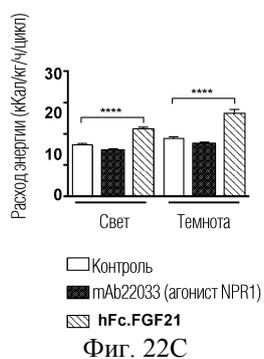
046104



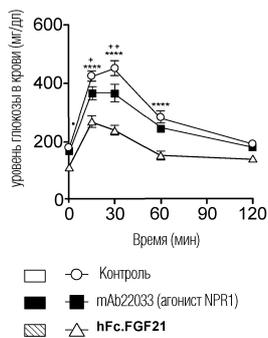
Фиг. 22А



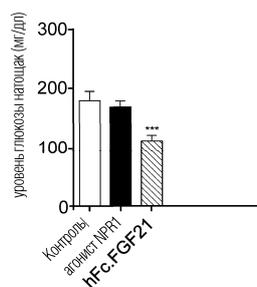
Фиг. 22В



Фиг. 22С



Фиг. 23А



Фиг. 23В