

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046377**

(13) **B1**

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

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.07
- (21) Номер заявки
202191870
- (22) Дата подачи заявки
2020.02.02
- (51) Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К FGF19**

- (31) **PCT/CN2019/074530**
- (32) **2019.02.02**
- (33) **CN**
- (43) **2021.12.15**
- (86) **PCT/CN2020/074154**
- (87) **WO 2020/156539 2020.08.06**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ХУАХУЭЙ ХЭЛС ЛТД. (CN)
- (72) Изобретатель:
Суй Цзяньхуа, Лю Хуэйси (CN)
- (74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)
- (56) **WO-A2-2007136893**
WO-A1-2009035786

-
- (57) Предложены антитела к FGF19, селективно нацеленные на N-конец фактора роста фибробластов 19 (FGF19), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Также предложены композиции и варианты применения указанных антител, а также способы лечения заболевания или нарушения, вызванных или связанных с аномальной передачей сигнала FGF19-FGFR4, например злокачественного новообразования, путем введения антител к FGF19.

B1

046377

046377

B1

Область техники

В настоящем документе раскрыты антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с фактором роста фибробластов 19 (FGF19), а именно с большинством остатков, составляющих эпитоп антител на N-конце FGF19. Также представлены композиции и варианты применения указанного антитела, а также способы лечения заболевания или нарушения, вызванных или связанных с аномальной передачей сигнала FGF19-FGFR, например злокачественного новообразования, путем введения антител к FGF19.

Уровень техники

Факторы роста фибробластов (FGF) представляют собой семейство белков, которые выполняют разнообразные функции в ходе развития организмов от нематод до человека. Было обнаружено, что для ряда процессов нормального развития и физиологических процессов особенно важное значение играет сигнальный путь FGF/FGFR (рецептор фактора роста фибробластов), нарушение регуляции которого может играть важную роль в развитии и прогрессировании опухоли (Turner N., Grose R., *Nature Reviews Cancer*, 2010, 10(2):116, <https://www.nature.com/articles/nrc2780>).

У человека фактор роста фибробластов 19 (FGF19) представляет собой индуцируемый желчными кислотами пептидный фактор роста, который регулирует метаболизм желчных кислот путем связывания экспрессируемого гепатоцитами рецептора фактора роста фибробластов 4 (FGFR4) и β -клото (KLD), что приводит к репрессированию печеночной транскрипции гена, кодирующего холестерин-7- α -гидроксилазу 1 (CYP7A1), важный фермент биосинтеза желчных кислот (M.H. Xie et al., *Cytokine*, 11, 729-735 (1999); J.A. Holt et al., *Genes & development*, 17, 1581-1591 (2003); H. Kurosu et al., *The Journal of biological chemistry*, 282, 26687-26695 (2007); и B.C. Lin et al., *The Journal of biological chemistry*, 282, 27277-27284 (2007)). Помимо его функции регуляции обмена жирных кислот, клинические наблюдения продемонстрировали, что как FGF19, так и родственный ему рецептор FGFR4 экспрессируются на высоком уровне в опухолевой ткани по сравнению с прилегающей неопухолевой тканью (E.T. Sawey et al., *Cancer Cell*, 19, 347-358 (2011); K. Wang et al., *Hepatology*, 58, 706-717 (2013); S.M. Ahn et al., *Hepatology*, 60, 1972-1982 (2014); K. Schulze et al., *Nat. Genet.*, 47, 505-511 (2015); M.H. Xie et al. (1999); L.R. Desnoyers et al., *Oncogene*, 27, 85-97 (2008); и Y. Li et al., *Oncotarget* (2016)).

Было высказано предположение, что FGF19 является драйверным геном в процессе развития гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), представляющей собой наиболее распространенный тип рака печени, на который приходится примерно 90% всех случаев рака печени (J.M. Llovet et al., *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2, 16018 (2016)). Рак печени находится на шестом месте среди наиболее часто диагностируемых злокачественных новообразований в мире и на третьем месте по частоте смертей, связанных с онкологическими заболеваниями, во всем мире (F. Bray et al., *CA Cancer J. Clin.*, 68, 394-424 (2018)). В нескольких клинических исследованиях было продемонстрировано, что для ГЦК характерна высокофокальная амплификация фактора роста фибробластов (FGF) 19 (E.T. Sawey et al., *Cancer Cell*, 19, 347-358 (2011); K. Wang et al., *Hepatology*, 58, 706-717 (2013)); S.M. Ahn et al., *Hepatology*, 60, 1972-1982 (2014); и K. Schulze et al., *Nat. Genet.*, 47, 505-511 (2015)). Было обнаружено, что высокий уровень экспрессии FGF19 и/или FGFR4 стимулирует опухолевую прогрессию и может служить предиктором плохого прогноза у пациентов с ГЦК (S. Miura et al., *BMC, Cancer*, 12, 56 (2012); и J. Hyeon, S. Ahn, J.J. Lee, D.H. Song, C.K. Park, *Digestive diseases and sciences*, 58, 1916-1922 (2013)). У трансгенных мышей сверхэкспрессия FGF19 приводила к развитию гепатоцеллюлярной дисплазии, неоплазии и, в конечном итоге, к ГЦК (K. Nicholes et al., *Am. J. Pathol.*, 160, 2295-2307 (2002)), которая была устранена у мышей с нокаутом FGFR4 (D.M. French et al., *PLoS One*, 7, e36713 (2012)), что механистически подтвердило канцерогенную активность aberrантного сигнального пути FGF19/FGFR4, обеспечивая теоретическую основу для разработки препаратов-антагонистов, мишенью которых является сигнальный путь FGF19/FGFR4, в качестве потенциального способа лечения злокачественных новообразований. Однако несколько селективных ингибиторов FGFR4, разрабатываемых для лечения ГЦК, приводили к увеличению синтеза желчных кислот и токсическому действию на печень либо в доклинических исследованиях на животных, либо в ранних фазах клинических испытаний на людях (M. Hagel et al., *Cancer Discov.*, 5, 424-437 (2015); R. Kim et al., *European Journal of Cancer*, 69, S41 (2016); S.L. Chan et al., *Cancer research*, 77, CT106-CT106 (2017); J.J. Joshi et al., *Cancer research*, 77, 6999-7013 (2017); и B. Ruggeri et al., *Cancer research*, 77, 1234-1234 (2017)). Были предприняты попытки разработки лекарств, терапевтической мишенью которых является непосредственно FGF19, для лечения ГЦК, и было получено нейтрализующее антитело к FGF19 (WO 2007136893 A2, Genentech, Inc). Терапия данным антителом к FGF19 (1A6) предотвращала развитие ГЦК у трансгенных мышей с сверхэкспрессией FGF19, а также данная терапия приводила к снижению роста ксенотрансплантатов ГЦК у мышей (E.T. Sawey et al., 2011, выше; и L.R. Desnoyers et al., 2008, выше). Однако, к сожалению, в токсикологическом исследовании введение гуманизированного антитела 1A6 яванским макакам приводило к повышению печеночной транскрипции CYP7A1 и усилению синтеза жирных кислот, тем самым существенно изменяя метаболизм желчных кислот и вызывая тяжелые дозозависимые побочные эффекты, такие как снижение массы тела, тяжелая диарея и снижение аппетита (R. Pai et al., *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 126, 446-456 (2012)). Принимая во внимание роль FGF19 в ре-

гуляции метаболизма желчных кислот, действие антител, мишенью которых является FGF19, может негативно сказаться на обычном физиологическом функционировании в данном аспекте и привести к неприемлемым побочным эффектам. Ввиду этих фактов клиническая терапия, нацеленная на FGF19 с помощью антитела, должна будет устранять такие побочные эффекты.

Настоящее изобретение удовлетворяет указанные потребности, обеспечивая антитела к FGF19, селективно нацеленные на N-конец FGF19, которые демонстрируют высокую эффективность при применении в качестве терапии ГЦК, не оказывая отрицательного эффекта на нормальную функцию регуляции желчных кислот FGF19.

Все ссылки, включая научные публикации, публикации патентных заявок и патентные публикации, включены в настоящую заявку в полном объеме для всех целей.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение частично основано на открытии новой области связывания на FGF19, а именно на N-конце FGF19, и выделении антител к FGF19, которые проявляют сильную противоопухолевую активность в отношении ГЦК, а также обладают желаемой безопасностью, заключающейся в отсутствии влияния на опосредованную FGF19 регуляцию синтеза желчных кислот путем специфического связывания с указанной связывающей областью на N-конце FGF19. Соответственно настоящее изобретение обеспечивает новую мишень на N-конце FGF19 с терапевтическим потенциалом, а также антитела, специфически связывающиеся с указанной мишенью для диагностики, профилактики, лечения и/или прогноза патологических состояний, связанных или возникших в результате аномального функционирования сигнального пути FGF19/FGFR4, в частности злокачественных новообразований, связанных или возникших в результате аномального функционирования сигнального пути FGF19/FGFR4, включая ГЦК, но не ограничиваясь ею. Также оно обеспечивает молекулы нуклеиновых кислот, векторы экспрессии и клетки-хозяева, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтические композиции, способы, наборы, препараты, связанные с модуляцией сигнального пути FGF19/FGFR4.

В первом аспекте настоящая заявка обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с фактором роста фибробластов человека 19 (FGF19), и процесс связывания зависит от N-конца FGF19. В одном варианте реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке связывается с эпитопом, расположенном на аминокислотных остатках в положениях 38-45 SEQ ID NO: 1. Если говорить конкретно, эпитоп содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь из следующих остатков FGF19 (SEQ ID NO: 1): W38, D40, P41, I42, R43, L44, R45. В дальнейшем варианте реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке связывается с эпитопом, состоящим из аминокислотных остатков в положениях 38-45 SEQ ID NO: 1 и по меньшей мере одним из следующих остатков человеческого FGF19 (SEQ ID NO: 1): E81, P167, L169. В дальнейшем варианте исследования антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:

(I) связывается с человеческим FGF19 со значением K_d составляющим от примерно 1×10^{-9} М до примерно 1×10^{-12} М, определенным методом поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или подобным методом;

(II) вступает в перекрестную реакцию с FGF19 яванского макака;

(III) блокирует связывание человеческого FGF19 с человеческим FGFR4 и/или с человеческим комплексом FGFR4-KLB;

(IV) подавляет FGF19-индуцированную клеточную пролиферацию;

(V) не влияет или минимально влияет на FGF19-подавленную экспрессию CYP7A1; и

(VI) не нарушает или незначительно нарушает гомеостаз желчных кислот, поддерживаемый FGF19.

В другом варианте реализации первого аспекта антитело к FGF-19 или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке содержит по меньшей мере один, два или три определяющих комплементарность участка (CDR) переменного домена тяжелой цепи (VH), содержащего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3, 4, 5, 13 или 19 или их варианты, содержащие консервативные замены. В другом варианте реализации антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке содержит по меньшей мере один, два или три определяющих комплементарность участка переменного домена легкой цепи (VL), содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 14 или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен. В другом варианте реализации антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке содержит по меньшей мере один, два или три определяющих комплементарность участка переменных доменов тяжелой цепи (VH), содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 14 или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают по меньшей мере одним из следующих свойств:

(I) связывается с человеческим FGF19 со значением K_d , составляющим от примерно 1×10^{-9} М до примерно 1×10^{-12} М, определенным методом поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE)

или подобным методом;

(II) вступает в перекрестную реакцию с FGF19 яванского макака;

(III) блокирует связывание человеческого FGF19 с человеческим FGFR4 и/или с человеческим комплексом FGFR4-KLB;

(IV) подавляет FGF19-индуцированную клеточную пролиферацию;

(V) не влияет или минимально влияет на FGF19-подавленную экспрессию CYP7A1; и

(VI) не нарушает или незначительно нарушает гомеостаз желчных кислот, поддерживаемый FGF19.

В одном варианте реализации антитело к FGF19 и антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке содержат

(а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1 (участок 1, определяющий комплементарность тяжелой цепи), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19 или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен; и/или

(б) вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1 (участок 1, определяющий комплементарность легкой цепи), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NP 7 или ее варианты, содержащие один или более консервативных повторов, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14 или их варианты, содержащие одну или более консервативную замену.

В одном варианте реализации антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке содержит

(а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR3, имеющий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 19; и/или

(б) вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 14.

В одном варианте реализации антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке содержит

(а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее варианты, содержащие один или более консервативных повторов, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен; и/или

(б) вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или ее варианты, содержащие одну или несколько консервативных замен, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SED ID NO: 8 или ее варианты, содержащие одну или несколько консервативных замен.

В более частном варианте реализации антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке содержит

(а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и/или

(б) вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

В одном варианте реализации антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке содержит

(а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее вариант, содержащий одну или более консервативных замен, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или ее вариант, содержащий одну или более консервативных замен, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или ее вариант, содержащий одну или более консервативных замен; и/или

(б) вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или ее вариант, содержащий одну или более консервативных замен, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или ее вариант, содержащий один или более консервативных замен, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или ее вариант, содержащий один или более консервативных замен.

ность SEQ ID NO: 21.

В одном предпочтительном варианте реализации антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке содержит тяжелую цепь, обладающую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательностей в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, 17 или 22; и/или легкую цепь, обладающую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательностей в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, 18 или 23. В одном предпочтительном варианте реализации антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, 17 или 22; и/или легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, 18 или 23.

В одном предпочтительном варианте реализации антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке содержит

(а) тяжелую цепь, обладающую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательностей в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, и/или легкую цепь, обладающую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательностей в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12;

(б) тяжелую цепь, обладающую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательностей в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и/или легкую цепь, обладающую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательностей в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18; или

(в) тяжелую цепь, обладающую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательностей в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и/или легкую цепь, обладающую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательностей в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

В одном предпочтительном варианте реализации антитело к FGF9 или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке содержит

(а) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и/или легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

(б) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и/или легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и

(в) тяжелую цепь имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и/или легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

В одном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с человеческим FGF19 с антителом, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В более частном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с человеческим FGF19 с антителом, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Более предпочтительно, чтобы указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имели по меньшей мере одно из следующих свойств:

(I) связывается с человеческим FGF19 со значением K_d , составляющим от примерно 1×10^{-9} М до примерно 1×10^{-12} М, определенным методом поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или подобным методом;

(II) вступает в перекрестную реакцию с FGF19 яванского макака;

(III) блокирует связывание человеческого FGF19 с человеческим FGFR4 и/или с человеческим комплексом FGFR4-KLB;

(IV) подавляет FGF19-индуцированную клеточную пролиферацию;

(V) не влияет или минимально влияет на FGF19-подавленную экспрессию CYP7A1; и

(VI) не нарушает или незначительно нарушает гомеостаз желчных кислот, поддерживаемый FGF19.

В одном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с человеческим FGF19 с антителом, содержащим переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 14. В более частном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с человеческим FGF19 с антителом, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. Более предпочтительно, чтобы указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имели по меньшей мере одно из следующих свойств:

(I) связывается с человеческим FGF19 со значением K_d , составляющим от примерно 1×10^{-9} до примерно 1×10^{-12} М, определенным методом поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или подобным методом;

(II) вступает в перекрестную реакцию с FGF19 яванского макака;

(III) блокирует связывание человеческого FGF19 с человеческим FGFR4 и/или с человеческим комплексом FGFR4-KLB;

(IV) подавляет FGF19-индуцированную клеточную пролиферацию;

(V) не влияет или минимально влияет на FGF19-подавленную экспрессию CYP7A1; и

(VI) не нарушает или незначительно нарушает гомеостаз желчных кислот, поддерживаемый FGF19.

В одном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с человеческим FGF19 с антителом, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В более частном варианте реализации антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с человеческим FGF19 с антителом, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. Более предпочтительно, чтобы указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имели по меньшей мере одно из следующих свойств:

(I) связывается с человеческим FGF19 со значением K_d , составляющим от примерно 1×10^{-9} М до примерно 1×10^{-12} М, определенным методом поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или подобным методом;

(II) вступает в перекрестную реакцию с FGF19 яванского макака;

(III) блокирует связывание человеческого FGF19 с человеческим FGFR4 и/или с человеческим комплексом FGFR4-KLB;

(IV) подавляет FGF19-индуцированную клеточную пролиферацию;

(V) не влияет или минимально влияет на FGF19-подавленную экспрессию CYP7A1; и

(VI) не нарушает или незначительно нарушает гомеостаз желчных кислот, поддерживаемый FGF19.

В одном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тем же эпитопом человеческого FGF19, что и антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В более частном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тем же эпитопом человеческого FGF19, что и антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Более предпочтительно, чтобы указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имели по меньшей мере одно из следующих свойств:

(I) связывается с человеческим FGF19 со значением K_d , составляющим от примерно 1×10^{-9} М до примерно 1×10^{-12} М, определенным методом поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или подобным методом;

(II) вступает в перекрестную реакцию с FGF19 яванского макака;

(III) блокирует связывание человеческого FGF19 с человеческим FGFR4 и/или с человеческим комплексом FGFR4-KLB;

(IV) подавляет FGF19-индуцированную клеточную пролиферацию;

(V) не влияет или минимально влияет на FGF19-подавленную экспрессию CYP7A1; и

(VI) не нарушает или незначительно нарушает гомеостаз желчных кислот, поддерживаемый FGF19.

В одном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тем же эпитопом человеческого FGF19, что и антитело, содер-

жащее переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В более частном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тем же эпитопом человеческого FGF19, что и антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. Более предпочтительно, чтобы указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имели по меньшей мере одно из следующих свойств:

(I) связывается с человеческим FGF19 со значением K_d , составляющим от примерно 1×10^{-9} М до примерно 1×10^{-12} М, определенным методом поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или подобным методом;

(II) вступает в перекрестную реакцию с FGF19 яванского макака;

(III) блокирует связывание человеческого FGF19 с человеческим FGFR4 и/или с человеческим комплексом FGFR4-KLB;

(IV) подавляет FGF19-индуцированную клеточную пролиферацию;

(V) не влияет или минимально влияет на FGF19-подавленную экспрессию CYP7A1; и

(VI) не нарушает или незначительно нарушает гомеостаз желчных кислот, поддерживаемый FGF19.

В одном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тем же эпитопом человеческого FGF19, что и антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В более частном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тем же эпитопом человеческого FGF19, что и антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. Более предпочтительно, чтобы указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имели по меньшей мере одно из следующих свойств:

(I) связывается с человеческим FGF19 со значением K_d , составляющим от примерно 1×10^{-9} М до примерно 1×10^{-12} М, определенным методом поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или подобным методом;

(II) вступает в перекрестную реакцию с FGF19 яванского макака;

(III) блокирует связывание человеческого FGF19 с человеческим FGFR4 и/или с человеческим комплексом FGFR4-KLB;

(IV) подавляет FGF19-индуцированную клеточную пролиферацию;

(V) не влияет или минимально влияет на FGF19-подавленную экспрессию CYP7A1; и

(VI) не нарушает или незначительно нарушает гомеостаз желчных кислот, поддерживаемый FGF19.

В одном варианте реализации антитело к FGF19 является человеческим антителом. В одном варианте реализации антитело к FGF19 является человеческим моноклональным антителом (mAb). В одном варианте реализации антитело к FGF19 является Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечным Fv (ScFv).

В одном варианте реализации антитело к FGF19 содержит константный участок тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или его вариацию, а также константный участок легкой цепи типа каппа или ламбда или его вариацию.

В одном варианте реализации антитело к FGF19 представляет собой выделенное антитело. В одном варианте реализации антитело к FGF19 представляет собой рекомбинантное антитело. В предпочтительном варианте реализации настоящее антитело или антигенсвязывающий фрагмент первого аспекта предназначены для лечения заболеваний, вызванного или связанного с аномальной активацией сигнального пути FGF19-FGFR4, включая введение субъекту, нуждающемуся в них. В частном варианте реализации, заболевание представляет собой злокачественное новообразование, вызванное или связанное с аномальной активацией сигнального пути FGF19-FGFR4. В более частном варианте реализации злокачественное новообразование представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК). Во втором аспекте настоящее открытие обеспечивает композицию, то есть фармацевтическую композицию, содержащую антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент согласно первому аспекту настоящей заявки, а также фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В предпочтительном варианте реализации фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество антитела к FGF19 или антигенсвязывающего фрагмента.

В третьем аспекте настоящее открытие обеспечивает набор, содержащий антитело к FGF19 или антигенсвязывающий фрагмент согласно первому аспекту настоящей заявки, или композицию согласно второму аспекту настоящей заявки. В предпочтительном варианте реализации набор содержит терапевтически эффективное количество антитела к FGF19 или антигенсвязывающего фрагмента.

В четвертом аспекте данное открытие обеспечивает метод профилактики или лечения заболевания, вызванного или связанного с аномальной активацией сигнального пути FGF19-FGFR4, включая введение субъекту, нуждающемуся в нем, терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно первому аспекту настоящей заявки, или фармацевтической композиции согласно второму аспекту настоящей заявки. В частном варианте реализации заболевание представляет собой злокачественное новообразование, вызванное или связанное с аномальной активацией сигнального пути FGF19-FGFR4. В более частном варианте реализации злокачественное новообразование представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК).

В пятом аспекте настоящее открытие обеспечивает метод для профилактики рецидивирования заболевания, вызванного или связанного с аномальной активацией сигнального пути FGF19-FGFR4, включая введение субъекту, нуждающемуся в нем, терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно первому аспекту настоящей заявки, или фармацевтической композиции согласно второму аспекту настоящей заявки. В частном варианте реализации, заболевание представляет собой злокачественное новообразование, вызванное или связанное с аномальной активацией сигнального пути FGF19-FGFR4. В более частном варианте реализации злокачественное новообразование представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК). В одном варианте реализации после хирургической операции наблюдалось рецидивирование заболевания. В шестом аспекте настоящее открытие обеспечивает использование антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно первому аспекту настоящей заявки или фармацевтической композиции согласно второму аспекту настоящей заявки для лечения различных заболеваний, описанных в данном документе. В частном варианте реализации заболевание представляет собой заболевание, вызванное или связанное с аномальной активацией сигнального пути FGF19-FGFR4, преимущественно злокачественное новообразование, вызванное или связанное с аномальной активацией сигнального пути FGF19-FGFR4. В более частном варианте реализации злокачественное новообразование является гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК). В одном варианте реализации после хирургической операции наблюдалось рецидивирование заболевания.

В седьмом аспекте настоящее открытие обеспечивает применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно первому аспекту настоящей заявки или фармацевтической композиции согласно второму аспекту настоящей заявки при производстве медикаментов для лечения различных заболеваний, описанных в данном документе, или для профилактики рецидивирования различных заболеваний, описанных в данном документе. В частном варианте реализации заболевание представляет собой заболевание, вызванное или связанное с аномальной активацией сигнального пути FGF19-FGFR4, преимущественно злокачественное новообразование, вызванное или связанное с аномальной активацией сигнального пути FGF19-FGFR4. В более частном варианте реализации злокачественное новообразование представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК). В одном варианте реализации после хирургической операции наблюдалось рецидивирование заболевания. В другом варианте реализации после хирургической операции наблюдалось рецидивирование заболевания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-1C показана незначительная роль N-конца FGF19 в опосредовании активности FGF19. (A) Показана аффинность связывания FGF19 или FGF19^{ANT} (вариант FGF19 с делецией N-конца) с FGFR4 или FGFR4-KLB комплексом. В случае FGF19^{ANT} (вариант с делецией N-конца) наблюдалась сниженная аффинность связывания с FGFR4. FGFR4-hFc был захвачен в качестве лиганда на сенсорном чипе в Biacore. Взаимодействия между лигандом FGFR4 и анализируемым компонентом FGF19 или FGF19^{ANT} были проанализированы в присутствии гепарина (20 мкг/мл). Анализируемые компоненты FGF19 или FGF19^{ANT} были взяты в двухкратных серийных разведениях от 1000 нмоль. (B) В случае FGF19^{ANT} (варианта с делецией N-конца) наблюдалась снижения активность индуцирования клеточной пролиферации. Hep3B культивировали с различными концентрациями FGF19 или FGF19^{ANT} в 1% ФБС, содержащей минимальную эссенциальную среду Игла, модифицированную по способу Дульбекко. (C) FGF19^{ANT} (вариант FGF19 с делецией N-конца) сохранял способность супрессировать экспрессию гена CYP7F1 *in vivo*. Мышей C57BL/6 не кормили перед внутрибрюшной инъекцией указанных препаратов. Экспрессию печеночного гена CYP7A1 анализировали с помощью метода кПЦП. Каждая лечебная группа состояла из 3 мышей-самцов и 3 мышей-самок.

Фиг. 2 является схематическим изображением, которое иллюстрирует образование G1A8 антитела с использованием технологии фазового дисплея антител. N-концевой пептид FGF19 или полноразмерный белок FGF19 использовали в качестве антигена для селекции против большой библиотеки неиммунных антител фазового дисплея авторов изобретения (D. Li et al., A potent human neutralizing antibody Fc-dependently reduces established HBV infections. *Elife*, 6 (2017)). Посредством последующего скрининга ИФА с использованием как полноразмерного FGF19, так и варианта с делецией N-конца (FGF19^{ANT}) бы-

ли идентифицированы антитела, которые связываются с FGF19 с более высокой аффинностью, чем FGF19^{ANT}. Штриховка темно-серым цветом указывает на более высокую аффинность по сравнению с ячейками, заштрихованными светло-серым или белым цветом. Белковые последовательности CDR3 как тяжелой цепи, так и легкой цепи одного идентифицированного антитела 31A3 и его антитела G1A8 с улучшенной аффинностью показаны параллельно, причем различные аминокислоты подчеркнуты.

На фиг. 3А, 3В показана улучшенная аффинность связывания и более высокая зависимость G1A8 от N-конца. (А) Кинетический анализ связывания антител к FGF19 31A3 или G1A8 с FGF19 с использованием ППР. FGF был взят в двукратных серийных разведениях от 100 нмоль. (В) Связывание как 31A3, так и G1A8 с FGF19 зависит от N-конца FGF19, что продемонстрировано различными профилями связывания при использовании FGF19 или FGF19^{ANT} в качестве мишени. Связывающую активность антител к FGF19 и FGF19^{ANT} анализировали с помощью ИФА.

На фиг. 4А-4С дано описание G1A8. (А) G1A8 и 31A3 показали способность ингибировать FGF19-индуцированную клеточную пролиферацию. Нер3В культивировали с FGF19 (20 нг/мл) и антителами к FGF19 (100 нмоль) или с антителом изотопического контроля. (В) G1A8 ингибирует взаимодействия между FGF19 и FGFR3. Антитело G1A8 или антитело изотопического контроля смешивали с FGFR4-Fc (100 нмоль) и гепарином (20 мкг/мл). Ингибирование связывания FGFR4 с FGF19 анализировали с помощью метода ИФА. (С) G1A8 не нарушало экспрессию гена CYP7A1 в печени мыши, подавляемую FGF19. Мышей C57BL/6 не кормили перед внутрибрюшной инъекцией указанными препаратами. Экспрессию печеночного гена CYP7A1 анализировали с помощью метода кПЦР. Каждая лечебная группа состояла из 3 мышей-самцов и 3 мышей-самок. FGF19, 0,1 мг/кг; G1A8, 5-кратный молярный избыток FGF19.

На фиг. 5А-5Е показана противоопухолевая активность G1A8, исследуемая на мышах с ксенотрансплантатом человеческой гепатоцеллюлярной карциномы. (А и В) G1A8 подавляет опухолевый рост на ранних стадиях развития опухоли. Стабильно экспрессирующую люциферазу Нер3В-люциферазу вводили подкожно (п/к) мышам линии NOD SCID. Мыши были разделены на две группы (n=6/группе) с эквивалентной средней интенсивностью биолюминесценции опухоли, в качестве лечения они получали 200 мкг G1A8 или антитело изотопического контроля. Рост опухоли оценивался с помощью штангенциркуля (А) и метода биолюминесценции (В и С). (D и E) G1A8 ингибировало опухолевый рост на поздней стадии развития опухоли. Мыши линии NSG, несущие опухолевые клетки Нер3В, были разделены на две группы (n=6/группа) с эквивалентным средним объемом опухоли, в качестве лечения они получали 200 мкг G1A8 или антитело изотопического контроля. Рост опухоли оценивался с помощью штангенциркуля (D), а выживаемость оценивалась с помощью анализа выживаемости Каплана-Мейера. (E) Дни, в которые проводили лечение антителами, отмечены стрелками.

На фиг. 6А-6L дана оценка безопасности G1A8 у яванских макаков. (А) Схематическая диаграмма, иллюстрирующая график введения G1A8 и забора проб у животных. Четыре яванские макаки были разделены на две группы, в одной из которых внутривенно вводили контрольный физиологический раствор (обозначено серым цветом) или G1A8-hIgG1 (обозначено черным цветом). Каждая группа состояла из одного самца (обозначены треугольником) и из одной самки (обозначены кругом) обезьяны. (В) Масса тела яванских макаков. (С-F) Биохимический анализ крови яванских макаков. Общий уровень желчных кислот (С), общий билирубин (D), АЛТ (E) и АСТ (F) в сыворотке крови яванских макаков были измерены в различные моменты времени. Пунктирная линия и точечная линия указывают нормальные контрольные интервалы биохимических параметров у самцов и самок яванских макаков, соответственно. (G и H) Экспрессия генов, связанных с метаболизмом желчных кислот. В конце исследования были взяты образцы тканей яванских макаков. Экспрессию отобранных генов в печени (G), подвздошной кишке (H) и почке (I) проанализировали с помощью метода кПЦР. (J и K) Фармакокинетический профиль G1A8. Были измерены концентрации G1A8 после введения 10 мг/кг G1A8 в день 1 (J) или 30 мг/кг G1A8 в день 16 (K). (L) Кинетический анализ связывания G1A8 с FGF19 яванской макаки. FGF19 яванской макаки был взят в двукратных серийных разведениях от 100 нмоль.

На фиг. 7А-7D показан структурный анализ комплекса FGF19-G1A8. (А) Ленточное представление FGF19-G1A8 в ортогональном виде. FGF19 показан черным цветом, а переменные домены тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) G1A8 - серым. Отмечены N-конец и C-конец FGF19. Константный домен G1A8 Fab удален для наглядности. (В) Вид на поверхность комплекса FGF19-G1A8. В структуре обнаруживается внешне совершенная комплементарность форм. (С) Подробный вид интерфейса G1A8-FGF19. Пунктирными линиями обозначены водородные связи. (D) Активность связывания G1A8 с мутантным FGF19 и FGF19 с заменой по аланину была проанализирована с использованием ППР.

На фиг. 8А-8С показана активность HS29. (А) Анализ связывания антител к FGF19 G1A8 и HS29 с мутантным FGF19 с заменой по аланину был проведен с использованием ППР. Мутантные FGF19 с заменой по аланину тестировали в концентрации 50 нмоль. (В) Кинетический анализ связывания HS29 с FGF19. FGF19 был взят в двукратном серийном разведении от 100 нмоль. (С) Ингибирование FGF19-индуцированной пролиферации клеток HS29. Нер3В культивировали с FGF19 (20 нг/мл) и антителами к FGF19 или антителами изотопического контроля (100 нмоль).

На фиг. 9A-9D дана оценка противоопухолевой активности HS29 на моделях ксенотрансплантата, полученного от пациента. Бестимусные мыши линии BALB/c, несущие FGF19-экспрессирующий ген PDX LI667 (A) или FGF19-неэкспрессирующий ген PDX LI667 (B), были разделены на группы (n=5/группа) с эквивалентным средним объемом опухоли, в одной группе мыши получали внутрибрюшную инъекцию HS29 (10 мг/кг), а в контрольной группе - не получали лечения. (C) Экспрессия мРНК FGF19 в моделях мышей. В конце исследования были взяты образцы тканей опухоли, и экспрессия FGF19 была проанализирована с помощью кПЦР. Каждая точка на графике представляет собой один образец опухоли мыши, и уровень экспрессии мРНК FGF19 культуральной клеточной линии Hep3В используется в качестве эталона. Пунктирная линия обозначает надежный предел обнаружения анализа. (D) Вес тела мышей, несущих PDX измерялся во время исследования.

Подробное описание изобретения

Определения.

Если определение не было специально дано в данном документе, все иные технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, как правило, понятное специалисту средней квалификации в области, к которой принадлежит данное изобретение.

Термин "или" используется для обозначения и используется взаимозаменяемо с термином "и/или", если контекст явно не диктует иное.

В контексте настоящего открытия, если не указано иное, формулировка "содержит" и ее вариации, такие как "содержащий", будут пониматься как подразумевающие включение указанного элемента, например аминокислотной последовательности, нуклеотидной последовательности, свойства, стадия или их группа, но не исключение любых других элементов, например аминокислотных последовательностей, нуклеотидных последовательностей, свойств и этапов. При использовании в данном документе термин "содержать" или его любой вариант может быть заменен термином "включать" или иногда "иметь" или его эквивалентным вариантом. В некоторых вариантах осуществления формулировка "содержать" также включает сценарий "состоящий из".

Используемый здесь термин "FGF19" относится к образуемому в подвздошной кишке гормону фактору роста фибробластов 19, который является лигандом с высоким родством к FGFR4 (рецептор фактора роста фибробластов 4). Как указано выше, FGF19 играет важную роль в регуляции синтеза желчных кислот, среди прочего, путем ингибирования транскрипции CYP7A1 в печени через рецепторные комплексы FGFR4/Klotho-β. В контексте настоящей заявки, если специально не указано иное, FGF19 обозначает человеческий FGF19. Ортологом человеческого FGF19 у мышей является FGF15. Аминокислотная последовательность FGF19, например FGF19 человека, и кодирующая ее нуклеотидная последовательность известны в данной области.

Семейство факторов роста фибробластов имеют гомологичную коровую область, образованную 12 антипараллельными (3-цепями, фланкированными расходящимися N-концом и C-концом (A. Beenken, M. Mohammadi, Nature reviews. Drug Discovery, 8, 235-253 (2009)). Вариации первичной последовательности между N- и C-концами различных FGF объясняют их различную биологическую активность (N. Itoh, D.M. Ornitz, J. Biochem., 149, 121-130 (2011); R. Goetz, M. Mohammadi, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 14, 166-180 (2013)).

Антитело и его антигенсвязывающий фрагмент.

Если не указано иное, термин "антитело" в контексте настоящего описания охватывает антитела, а также фрагменты антител в самом широком смысле в том случае, если они распознают и связываются с человеческим FGF19. В частности, антитело согласно настоящей заявке связывается с N-концом человеческого FGF19, а именно с аминокислотными остатками 38-45 FGF19, имеющими аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Антитело согласно настоящей заявке, в целом, является моноспецифическим антителом. Но в данной заявке также рассматривается антитело с гетерологической специфичностью (гетероспецифическое) или мультиспецифическое антитело. Антитело связывается со специфическими антигенными детерминантами или эпитопами посредством специфических сайтов связывания. Термин "фрагмент антитела" обозначает часть полноразмерного антитела, обычно содержащего связывающий или вариабельный участок для антитела. К примерам фрагментов антител можно отнести Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-фрагменты; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Наиболее часто встречаемая базовая структура антитела - это тетрамер. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, каждая пара имеет одну меньшую цепь, обозначаемую как "легкая цепь" (около 25 кДа), и одну большую цепь, обозначаемую как "тяжелая цепь" (около 50-70 кДа). На аминоконце каждой цепи она имеет вариабельный домен, состоящий из 100-110 или более аминокислот, преимущественно ответственных за распознавание антитела. Карбокси-концевая часть тяжелой цепи может определять константный участок, преимущественно ответственный за эффекторную функцию. Обычно легкие цепи человеческих антител классифицируются на каппа- и лямбда-легкие цепи. Кроме того, тяжелые цепи человеческих антител обычно классифицируются на α, δ, ε, γ, или μ и определяют изотипы антител (IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно) и их подклассы (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Вариабельные облас-

ти/домены каждой пары легких/тяжелой цепи (VL/VH) образуют сайт связывания антитела. Соответственно интактное антитело обычно имеет два участка связывания. Термин "гипервариабельный домен" обозначает аминокислотные остатки антитела, ответственные за связывание антигена. Гипервариабельный домен содержит аминокислотные остатки "определяющего комплементарность участка (CDR)" (т.е. L_{CDR1}, L_{CDR2} и L_{CDR3} в вариабельном домене легкой цепи и H_{CDR1}, H_{CDR2}, H_{CDR3} в вариабельном домене тяжелой цепи). Обычно вариабельные домены как тяжелой, так и легкой цепи содержат три гипервариабельных домена, называемых CDR, которые расположены между относительно консервативными "каркасными участками" или "КУ". CDR обычно выравниваются по каркасным областям, что позволяет связываться со специфическим эпитопом. Как правило, от N-конца до C-конца вариабельные домены как легкой, так и тяжелой цепи содержат FR-1 (или FR1), CDR-1 (или CDR1), FR-2 (FR2), CDR-2 (CDR2), FR-3 (FR3), CDR3 (CDR3) и FR-4 (или FR4). Номенклатура Кэбота используется для аминокислотных остатков антитела, если не указано иное (Kabat et al., *Sequence of proteins of immunological interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)).

Если не указано иное, термины "фрагмент антитела", "мишень-связывающий фрагмент" и "антиген-связывающий фрагмент" являются взаимозаменяемыми в контексте настоящей заявки и обозначают фрагменты антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (FGF19 или, в частности, N-конец FGF19), связываемого полноразмерным антителом, т.е. фрагменты, которые сохранили один или более CDR. К примерам антигенсвязывающих фрагментов относятся, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-фрагменты; диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител, например, одноцепочечный Fv-фрагмент (ScFv); нанотела и мультиспецифические антитела, образованные фрагментами антител.

Под "специфическим связыванием" или "специфическим связыванием с" понимается, что антитело демонстрирует предпочтительное связывание с определенной мишенью по сравнению с другими белками, но эта специфичность не требует абсолютной специфичности связывания. Антитело считается "специфическим" по отношению к мишени, если его связывание определяет присутствие целевого белка в образце, т.е. без получения нежелательных результатов, таких как ложноположительный. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке будет связываться с целевым белком, аффинность которого по меньшей мере в 2 раза выше, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше, и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 100 раз выше, чем аффинность нецелевых белков. Альтернативно или дополнительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке будет иметь аффинность связывания с его целевым белком, выражаемую в КД, ниже чем 1×10^{-8} моль, ниже чем 1×10^{-9} моль (1 нмоль), ниже чем 1×10^{-10} моль, ниже чем 1×10^{-11} моль, или даже ниже чем 1×10^{-12} моль (1 пмоль). Утверждается, что антитело согласно настоящей заявке связывается специфически с полипептидом, содержащим данную аминокислотную последовательность, т.е. аминокислотную последовательность зрелого человеческого FGF19 или N-концевые остатки (38-45) человеческого FGF19, если он связывается с полипептидами, содержащими данную последовательность, но не связывается с белками, у которых данная последовательность отсутствует. Используемый здесь термин "человеческое антитело" обозначает антитело, которое содержит только белковые последовательности иммуноглобулина человека. Человеческое антитело может содержать мышинные углеводные цепи, если оно продуцируется мышью, клеткой мыши или гибридомой, полученной из клетки мыши. Аналогичным образом "мышинное антитело" или "крысиное антитело" обозначают антитело, содержащее только последовательность белка только иммуноглобулина мыши или крысы, соответственно. Термины "моноклональное антитело", или "мАб", или "Маб" в контексте настоящего описания относятся к популяции по сути гомогенных антител, что означает, что молекулы антител, входящие в популяцию, идентичны по аминокислотной последовательности, за исключением естественно возникающих мутаций, которые могут присутствовать в небольших количествах. Под термином "моноклональный" понимается характер антитела, полученного по сути из гомогенной популяции антител, и он не должен трактоваться как требующий получения антитела каким-либо конкретным методом. Моноклональные антитела (мАб) могут быть получены традиционными методами, известными в данной области. См., например, Kohler G et al., *Nature*, 1975, 256:495-497; патент США № 4376110; Ausubel F.M. et al., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, 1992; Harlow E. et al., *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold spring Harbor Laboratory, 1988; Colligan J.E. et al., *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, 1993.

В одном варианте реализации антитело согласно настоящей заявке, специфически связывающееся с человеческим FGF19, также показало перекрестную реактивность с ортологом человеческого FGF19, имеющимся у яванских макаков. Используемый здесь термин "перекрестная реактивность" относится к способности антитела вступать в реакцию с гомологичным или ортологичным белком, характерным для другого вида. Перекрестная реактивность антитела может быть определена с использованием любого метода, известного в данной области. Например, она может быть определена путем измерения аффинности связывания с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или аналогичным методом (например, KinExa или OCTET).

В некоторых вариантах реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке не связывается или оказывает минимальное влияние на FGF19-супрессивную экспрессию CYP7A1. Другими словами, экспрессия CYP7A1 сравнительно ингибируется FGF19 при введении антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Если конкретнее, изменение или специфическое повышение уровня экспрессии CYP7A1 составило не более 5, 10, 15 или 20% после введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента в присутствии FGF19. В некоторых вариантах реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке не нарушает или незначительно нарушает поддерживаемый FGF19 гомеостаз желчных кислот. Стабильный гомеостаз желчных кислот может быть определен путем мониторинга уровня транскрипции или экспрессии одного или более генов, участвующих в метаболизме желчных кислот в соответствующих тканях. Например, указанные гены могут быть генами, кодирующими белки-переносчики желчных кислот. К конкретным генам, которым могут быть проанализированы, относятся ASBT, IBABP, CYP7A1, NTCP, OATP2, BSEP, OST α , OST β , MRP2, MRP3, и/или MRP4 в печени, почках и/или подвздошной кишке. Изменение уровня экспрессии одного или более генов ASBT, IBABP, CYP7A1, NTCP, OATP2, BSEP, OST α , OST β , MRP2, MRP3, и/или MRP4 в печени, почках и/или подвздошной кишке ограничено, например, не более 5, 10, 15 или 20% после введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента в присутствии FGF19.

Антитело по настоящей заявке можно подвергнуть процессу очистки для удаления нежелательных материалов, что приведет к получению очищенного антитела. Обычные методы очистки антител включают, но не ограничиваются ими, методы колоночной хроматографии, которые хорошо известны в данной области.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке может быть выделенным антителом. Под термином "выделенный" понимается то, что антитела или антигенсвязывающие фрагменты, по меньшей мере, частично свободны от других биологических материалов или небιологических материалов из клеток, культур клеток, питательной среды, системы экспрессии, в которой они продуцируются. Указанные материалы могут включать нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы, буфер, соль и другие материалы, такие как продукты распада клеток и питательную среду.

Настоящая заявка также рассматривает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий одну или несколько консервативных замен, при условии, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с FGF19 и обладает по меньшей мере одним из свойств антитела, описанных в данном документе. "Консервативные замены" аминокислот хорошо известны в данной области и обычно относятся к замене одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток, имеющий аналогичную боковую цепь по структуре или функции. Например, примерный список консервативных структур представлен в таблице ниже.

Изначальный аминокислотный остаток	Консервативная(ые) замена(ы)
Ала	Гли; Сер
Арг	Лиз; Гис
Асн	Глн; Гис
Асп	Глн; Асн
Цис	Сер; Ала
Глн	Асн
Глн	Асп; Глн
Гли	Ала
Гис	Асн; Глн
Иле	Лей; Вал
Лей	Иле; Вал

Лиз	Арг; Гис
Мет	Лей; Иле; Тир
Фен	Тир; Мет; Лей
Про	Ала
Сер	Тре
Тре	Сер
Трп	Тир; Фен
Тир	Трп; Фен
Вал	Иле; Лей

Настоящая заявка также обеспечивает выделенную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его фрагмент. Под терминами "выделенная нуклеиновая кислота" или "выделенный полинуклеотид" понимаются ДНК или РНК, которая удалена из всего или части полинуклеотида, в котором выделенный полинуклеотид встречается в природе, или связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в естественных условиях. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты "содержащая" конкретную нуклеотидную последовательность может включать, помимо указанной последовательности, функционально связанные регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию кодирующей области указанных последовательностей нуклеиновых кислот. Специалист в данной области может понять, что конкретная аминокислотная последовательность может кодироваться разными нуклеотидными последовательностями вследствие вырожденности кодонов.

Применение в терапевтических целях.

Настоящее открытие обеспечивает метод для профилактики рецидивирования заболевания, вызванного или связанного с аномальной активацией сигнального пути FGF19-FGFR4, включая введение субъекту, нуждающемуся в нем, терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно первому аспекту настоящей заявки, или фармацевтической композиции согласно второму аспекту настоящей заявки. В частном варианте реализации заболевание представляет собой злокачественное новообразование, вызванное или связанное с аномальной активацией сигнального пути FGF19-FGFR4. В более частном варианте реализации злокачественное новообразование представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК). Используемые здесь термины "введение" и "лечение" применительно к субъекту, например к животному, включая человека, или к клетке, ткани, органу или биологической жидкости, означает контакт экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического агента или композиции с субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. Обработка клетки включает контакт реагента с клеткой, а также контакт реагента с жидкостью, при этом жидкость контактирует с клеткой. Термины "введение" и "лечение" также включают лечение *in vitro* и *ex vivo*, например, клетки, реагентом, диагностическим, связывающим соединением или другой клеткой.

Термин "терапевтически эффективное количество" в контексте настоящего описания относится к количеству антитела, которое при введении субъекту для лечения заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания, является достаточным для развития эффекта данного заболевания или симптома. "Терапевтически эффективное количество" может варьироваться в зависимости от антитела, заболевания и/или симптома заболевания, тяжести заболевания и/или симптомов, возраста субъекта, получающего лечение, а также веса субъекта, получающего лечение. Подходящее количество в любом конкретном случае может быть очевидным для специалистов в данной области или может быть определено с помощью рутинных опытов. В случае комплексной терапии "терапевтически эффективное количество" относится к общему количеству комбинируемых объектов для эффективного лечения заболевания или состояния.

В контексте настоящей заявки под "субъектом" понимается животное, предпочтительно млекопитающее, т.е. примат, предпочтительно высший примат, например человек. Термины "злокачественное новообразование" или "опухоль" в данном контексте описывают физиологическое состояние млекопитающих, которое типично характеризуется нерегулируемым ростом клеток. В предпочтительном варианте реализации, злокачественное новообразование связано с aberrантной передачей сигнала сигнальным путем FGF19-FGFR4. Можно предположить, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке могут быть использованы для лечения, например, рака груди, рака простаты, рака толстой кишки, рака легких и рака желудка.

Примеры

Материалы и методы.

Следующие материалы и методы используются в примерах.

Клеточные линии.

Клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека Hep3В была любезным подарком от доктора Фэнминга Лу в Научном центре здравоохранения Пекинского университета. Клетки Hep3В культивировали в минимальной эссенциальной среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, DMEM, C11965500BT). Клетки культивировали в увлажненном инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Стабильная линия клеток Hep3В-Luc32, экспрессирующая репортерный ген люциферазы светлячка, была получена путем трансдукции лентивируса и отобрана с помощью пурамицина.

Клеточная линия FreeStyle 293-F была культивирована в среде экспрессии FreeStyle™ 293 (как клеточная линия, так и среда выпущены Thermal Fisher Scientific) в увлажненном орбитальном шейкере при 37°C в атмосфере 8% CO₂.

Экспрессия и очистка белков.

Для человеческого FGF19 (SEQ ID NO: 1) и его вариантов, включая вариант с делецией N-конца FGF19^{ΔNT} (имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам Arg43-Lys216 SEQ ID NO: 1) и мутированный FGF19 с заменой на аланин, кодирующие последовательности для белков клонировали в вектор экспрессии клеток млекопитающих с C-концевой меткой His-Avi, и их временно трансфицировали отдельно или котрансфицировали вектором экспрессии, кодирующим белковую последовательность биотин-протеин лигазы BirA E.coli в клетку FreeStyle 293-F (Thermal Fisher Scientific) в соотношении 1:1. Для создания полноразмерного человеческого антитела IgG1 кодирующая последовательности VH и VL были клонированы, соответственно, в вектор экспрессии тяжелой цепи IgG1 клеток млекопитающих и вектор экспрессии легкой цепи IgG1 клеток млекопитающих. Клетки FreeStyle были временно котрансфицированы с двумя экспрессионными плазмидами (плазмиды тяжелой цепи и легкой цепи) в соотношении 1:1. Через 3-5 дней после трансфекции супернатант клеточной культуры был собран для очистки человеческого IgG1 с использованием аффинной хроматографии с гранулами протеина А (GE Healthcare Life Sciences).

Скрининг библиотеки антител против FGF19.

N-концевой пептид FGF19 (SEQ ID NO: 24), состоящий из остатков от Arg23 до Ile42 N-концевого пептида FGF19, за которым следуют 5 аминокислот (SGSGK) с модификацией биотина на C-конце, был синтезирован Scilight-пептидом (Пекин, Китай) с чистотой более 95%. N-концевой пептид FGF19 или биотинилированный полноразмерный белок FGF19 был захвачен в качестве целевого белка на магнитных M-280 Dynabeads®, конъюгированных со стрептавидином (Thermal Fisher Scientific), а затем инкубирован с частицами фаг-scFv в количестве 5×10^{12} (одноцепочечный фрагмент варибельного домена), приготовленными из фаг-дисплейной библиотеки неиммунных антител человека, созданных из мононуклеарных клеток периферической крови 93 здоровых доноров (размер $1,0 \times 10^{10}$). Было проведено два раунда отбора. Для второго раунда отбора использовалось уменьшенное количество целевого белка и проводились обширные этапы промывки. Обычный основной раствор триэтаноламина использовали для элюирования фагов, которые специфически связывались с целевым белком. Впоследствии отдельные клоны были отобраны и сохранены для создания комплексов фаг-scFv в супернатанте бактериальной культуры; был проведен скрининг, анализирующий способность специфического связывания N-конца FGF19 в иммуноферментном анализе (ИФА) путем сравнения связывания с полноразмерным FGF19 и вариантом FGF19 с делецией N-конца (FGF19^{ΔNT}). Клоны, которые связываются с FGF19 с более высокой аффинностью, чем FGF19^{ΔNT}, были отобраны в качестве кандидатов, специфически связывающихся с N-концом FGF19, и гены варибельных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей данных клонов были секвенированы.

Соответствующие аминокислотные последовательности выбранных клонов были выровнены для устранения повторяющихся клонов и, таким образом, идентификации уникальных антител для дальнейшей характеристики.

Создание суббиблиотеки антител 31A3 и отбор для улучшения аффинности.

Для улучшения аффинности антитела 31A3 посредством CDR3-нацеленной рандомизации была создана суббиблиотека со случайным мутагенезом для HCDR3 и LCDR3 31A3 с помощью вырожденных кодонов ряда NNK. Размер сконструированной суббиблиотеки антител составлял $1,23 \times 10^8$. Отбор и скрининг антител суббиблиотеки проводились аналогично описанному выше методу для скрининга библиотеки антител к FGF19. Для получения высокоаффинных результатов из магнитных шариков использовали конкурентное элюирование человеческого IgG1 31A3. Впоследствии отдельные клоны были отобраны и сохранены для получения фаг-SCFV в супернатанте бактериальной культуры для скрининга на способность связывания с FGF19. Были сохранены только результаты с более высокой аффинностью, чем 31A3.

ИФА.

NeutrAvidin (Sigma Aldrich, 2 мкг/мл) в физиологическом растворе с фосфатным буфером наносили на 96-луночный планшет с U-образным дном (Nunc, MaxiSorp™) по 100 мкл на лунку и инкубировали при 4°C в течение ночи. Затем биотинилированный FGF19 или варианты FGF19 помещали на планшеты (по 100 мкл на лунку) путем инкубации при 30°C в течение 0,5-1 ч. FGF19 или варианты FGF19 также наносили прямо на 96-луночный планшет с U-образным дном из расчета 100 мкл на лунку и инкубировали при 4°C в течение ночи. Для ИФА, в котором используется человеческое IgG1, трехкратно серийно разведенные антитела в ФСБ, содержащем 2% обезжиренного молока, добавляли по 100 мкл в лунку. В случае конкурентного ИФА тестируемые антитела были взяты в трехкратном серийном разведении и смешаны с конкурирующим FGFR4-hFc. Связанные антитела затем обнаруживали, используя козьи антитела к человеческому Fc, конъюгированные с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific). Кинетический анализ связывания методом анализа поверхностного плазменного резонанса (ППР) Кинетический анализ человеческих IgG1-антител к FGF19 согласно настоящей заявке был выполнен с использованием системы Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences) при 25°C. Антитела к человеческому Fc (GE Healthcare Life Sciences) были иммобилизованы на сенсорный чип CM5 с помощью набора для иммобилизации по аминокислотной группе (GE Healthcare Life Sciences). Человеческие IgG1-антитела к FGF19 согласно настоящей заявке были захвачены в качестве лиганда на сенсорном чипе с последующим введением анализата FGF19 (в 2-кратном серийном разведении от 100 нмоль) или мутантного FGF19 с заменой на аланин (50 нмоль) в каждую проточную кювету. Введение буфера (ГБС с Tween20 и 0,3 ммоль ЭДТА) служило отрицательным контролем. 3 ммоль MgCl₂ использовали в качестве буфера обновления между каждым циклом ассоциации и диссоциации. Скорости ассоциации (k_a), скорости диссоциации (k_d) и константы сродства (K_D) были рассчитаны с использованием программного обеспечения BiacoreT200.

Анализ пролиферации клеток.

Человеческая клеточная линия ГЦК Нер3В была обработана различными концентрациями FGF19 или вариантами FGF19 в минимальной эссенциальной среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко с добавлением 1% фетальной бычьей сыворотки для индукции избыточной пролиферации клеток. Для оценки ингибирующей активности против FGF19-индуцированной клеточной пролиферации антителами к FGF19 в среду для культивирования клеток добавляли 15 мкг/мл (100 нмоль) человеческого IgG1-антитела. Спустя 72 ч клеточная пролиферация была проанализирована с помощью Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies) в соответствии с инструкцией производителя продукта.

Экспрессия CYP7A1 в печени.

Мышей линии C57BL/6 в возрасте 5-6 недель не кормили в течение ночи перед внутрибрюшной (в/б) инъекцией 2 мкг (1) FGF19, (2) вариантов FGF19 или (3) FGF19 в сочетании с 60 мкг антител к FGF19. Мышей умерщвляли через 3 ч после в/б инъекции и выполняли забор печени. Для последующего анализа уровней экспрессии мРНК CYP7A1 общую РНК печени экстрагировали с использованием реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific), а комплементарную ДНК (кДНК) получали путем обратной транскрипции с использованием набора Prime Script RT-PCR Kit (Takara). Уровень экспрессии мРНК CYP7A1 (относительно GAPDH) оценивали с помощью кПЦП с помощью прибора ABI Fast 7500 (Applied Biosystems) в реальном времени.

Эксперименты на животных.

Мыши линий NOD SCID и NSG использовались для оценки противоопухолевой активности антител к FGF19. Мышам в возрасте 6-8 недель подкожно вводили 5×10^6 клеток Нер3В (100 мкл на мыш) в правый бок. Мыши были разделены на три группы (n=6 на группу) на основании эквивалентной средней интенсивности биолюминесценции опухоли или объема опухоли, и они получали внутрибрюшную (в/б) инъекцию G1A8 (200 мкг) или контрольный IgG дважды в неделю. Интенсивность биолюминесценции опухоли *in vivo* у мышей с опухолью измеряли с использованием системы визуализации IVIS Lumina III *In vivo* (PerkinElmer) после внутрибрюшной инъекции 15 мг/кг D-люциферина (PerkinElmer). Объем опухоли был измерен с помощью электронного штангенциркуля и рассчитан с помощью формулы $3.14 \times L \times W^2 / 6$, где L и W - это самый большой и самый маленький диаметры, соответственно. Все протоколы экспериментов на животных были проведены в соответствии с национальными руководствами по содержанию и уходу за лабораторными животными в Китае и были выполнены в соответствии с установленными правилами после одобрения комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных при Национальном институте биологических наук. Исследование по оценке противоопухолевой активности антител в ксенотрансплантате, полученном от пациента, у бестимусных мышей линии BALD/c было проведено в соответствии с утвержденными протоколами комитета по содержанию и использованию лабораторных животных в Crown Bioscience Inc.

Оценка безопасности антитела согласно настоящей заявке, а именно G1A8 была проведена в JOINN Laboratories (Пекин), Inc. 3-4-летним здоровым яванским макакам, ранее не получавшим лечения, весом ~3 кг внутривенно вводили антитело G1A8 в количестве 30 мг/кг массы тела или водный раствор хлорида натрия в качестве контроля на 16 день в количестве 30 мг/кг массы тела. Была проведена оценка клинических наблюдений, массы тела, температуры тела, химического состава крови и анатомической патоло-

гии. Образцы крови собирали в различные моменты времени (день 1, день 8, день 15, день 23 и день 30) для фармакокинетического анализа G1A8. Образцы тканей печени, подвздошной кишки и почек были собраны в конце исследования для анализа РНК генов, связанных с метаболизмом желчных кислот.

Кристаллизация и структурное определение комплекса FGF19-G1A8.

FGF19 и G1A8-Fab были отдельно экспрессированы в клетках клеточной линии FreeStyle 293-F и индивидуально очищены методом проточной хроматографии на основе Ni-NTA (QIAGEN). Чтобы получить комплекс FGF-G1AB, FGF19 и G1A8-Fab были смешаны в молярном соотношении 1:1, инкубированы при 4°C в течение ночи, а затем очищены с помощью колонны Superdex S200 10/300 (GE Healthcare) с буфером, содержащим 10 ммоль трис-HCl (pH 8.0) и 500 ммоль NaCl. Очищенный комплекс FGF19-G1A8 затем концентрировали до 18 мг/мл и кристаллизовали при 20°C, используя метод висячей капли посредством диффузии в парах, смешивая 1 мкл белка и 1 мкл резервуарного раствора, содержащего 0,2 моль моногидрата сульфата лития, 0,1 моль бис-трис (pH 6.9) и полиэтиленгликоль (мас./об.=26%). Кристаллы четырехугольной формы появились через 7 дней. Кристаллы подвергались быстрой заморозке в жидком азоте.

Данные, полученные при применении рентгенодифракционного метода, были собраны на шанхайском канале синхротронного излучения (SSRF) BL17U. Данные обрабатывались в HKL2000 и XDS. Кристаллы принадлежат к пространственной группе P212121 и содержат две копии комплекса FGF19-G1A8 на асимметричную единицу. Структура была определена с помощью метода молекулярного замещения с использованием Phaser и Phenix со следующими структурами в качестве поисковых моделей: FGF19 (PDB ID: 2P23) и структура Fab к стероиду 5F2 (PDB ID: 3KDM). Модель была итеративно разработана в Coot и доработана в PHENIX.

Статистический анализ.

Все анализы были выполнены с использованием GraphPad Prism версии 6.00. Для сравнения между группами использовали обычный односторонний дисперсионный анализ ANOVA или непарный Т-критерий Стьюдента. Для оценки непрерывных переменных использовались двусторонний дисперсионный анализ ANOVA и критерий множественных сравнений Тьюки. Для анализа выживаемости использовали методы анализа выживаемости Каплана-Мейера и логарифмического рангового критерия.

Пример 1. Обнаружение связывающей мишени на N-конце FGF19.

Авторы настоящего изобретения выполнили множество анализов, чтобы выяснить, существует ли функциональная разница между полноразмерным FGF19 и его версией с делецией N-конца.

Было обнаружено, что по сравнению с полноразмерным FGF19 вариант FGF19^{ANT} (FGF19^{ANT}, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам Arg43-Лиз216 SEQ ID NO: 1) имел значительно более слабую аффинность связывания с FGFR4 и проявлял значительно меньшую активность индукции пролиферации опухолевых клеток в анализе *in vitro* (фиг. 1A и 1C).

В дальнейшем проводилась оценка функции регуляции метаболизма желчных кислот, осуществляемой полноразмерным FGF19 и указанным вариантом FGF19^{ANT} с делецией N-конца. В данном исследовании использовались мыши, поскольку было обнаружено, что эндогенный FGF19 способен осуществлять функцию регуляции метаболизма желчных кислот путем связывания с рецептором мыши FGFR4, имеющим 90% идентичность аминокислот с человеческим FGFR4, что приводит к супрессии печеночной транскрипции CYP7A1 у мышей (M. Zhou et al., 2014, выше; R. Goetz et al., *Molecular and cellular biology*, 27, 3417-3428 (2007)). После интраперитонеальной инъекции FGF19 или FGF19^{ANT} оценивали уровни экспрессии гена CYP7A1 в печени у данных мышей. Статистически значимой разницы между полноразмерным вариантом и N-концевым вариантом FGF19^{ANT} в регуляции метаболизма желчных кислот за счет репрессии уровня экспрессии гена CYP7A1 в печени не наблюдалось. В свете данных результатов можно разумно ожидать, что терапевтический агент, мишенью которого является N-конец FGF19, может потенциально подавлять его канцерогенную активность без отрицательного влияния на его физиологическую функцию регуляции метаболизма желчных кислот.

Пример 2. Получение антител, специфически нацеленных на N-конец человеческого FGF19.

Следующие две стратегии, в которых в качестве мишени для связывания использовалась или SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 24, были разработаны для идентификации антител, специфической мишенью которых является N-конец FGF19 (фиг. 2). Отбор антител проводился либо с использованием N-терминального пептида FGF19 (SEQ ID NO: 24) или полноразмерного FGF19 (SEQ ID NO: 1) в качестве мишени для связывания, и была отобрана большая фаг-дисплейная библиотека неиммунных человеческих антител (D. Li et al., *Elife*, 6, 2017, выше). Антитела, продемонстрировавшие способность связываться как N-терминальным фрагментом FGF19, так и с полноразмерным FGF19 были отобраны для следующего этапа скрининга. На следующем этапе скрининга с использованием метода ИФА как полноразмерный FGF19, так и его вариант с делецией N-конца (FGF19^{ANT}) использовались в качестве мишени для связывания, чтобы выявить антитела, которые способны связываться с полноразмерным FGF19, но не могут (или слабо связываются) с FGF19^{ANT}. Среди ряда идентифицированных антител для дальнейшего анализа было выбрано антитело, обозначенное как 31A3, которое показано относительно высокую аффинность связывания и специфически распознало N-конец FGF19 (фиг. 2 и 3).

Пример 3. Оценка ингибирующего действия 31A3 *in vitro* на опухолевую активность FGF19.

Анализы антипролиферации проводили для оценки способности 31A3 ингибировать канцерогенную активность FGF19 *in vitro*. Чтобы оценить, может ли 31A3 ингибировать пролиферацию клеток ГЦК, специфически индуцированную FGF19, клеточная линия ГЦК Her3B была обработана 31A3 в присутствии экзогенного FGF19. Как показано на рисунке 4A, 31A3 ингибирует FGF19-индуцированную пролиферацию клеток Her3B.

Пример 4. Создание мутантных антител на основе 31A3 с улучшенной аффинностью связывания.

Чтобы усилить аффинность 31A3 по отношению к N-концу FGF19, в участках HCDR3 и LCDR3 31A3 был выполнен сайт-направленный аланинсканирующий мутагенез, показавший, что четыре аминокислотных остатка, а именно V96 и W97 в HCDR3 и Y91 и T95 в LCDR3 могут быть потенциальными кандидатами для улучшения аффинности связывания путем замены на другие аминокислоты. Затем авторы настоящего изобретения создали фаг-дисплейную библиотеку, содержащую производные от 31A3 антитела с рандомизированными мутациями в четырех вышеуказанных положениях в участках HCDR3 и LCDR3. Во время селекции суббиблиотеки антител, полученных из 31A3, белок 31A3-hIgG1 использовался в качестве конкурента для скрининга связывающих веществ с более высокой аффинностью связывания по отношению к FGF19. После стадии строгого отбора биопэннинга была получена небольшая панель антител с улучшенной аффинностью. Одно из полученных антител, G1A8, отличающееся от 31A3 тремя аминокислотами, продемонстрировало 27-кратное увеличение аффинности и 60-кратное снижение скорости диссоциации, а также более мощную антипролиферативную активность, чем исходное антитело 31A3 (фиг. 2, 3A, 3B и 4A).

Другой вариант антитела HS29 был создан на основе анализа последовательности небольшой панели антител, полученных в результате пэннинга. HS29 имеет такой же эпитоп, антипролиферативную активность и аффинность связывания, что и G1A8 (фиг. 8).

Пример 5. Эффективность *in vitro* и *in vivo*.

В исследованиях активности *in vitro* G1A8 блокировал FGF19-FGFR4 взаимодействие со значениями IC50, равными 1,39 нмоль (фиг. 4B). Кроме того, G1A8 продемонстрировало сильный антипролиферативный эффект на клетки Her3B, обработанные экзогенным FGF19 (фиг. 4A). Затем его противоопухолевую активность *in vivo* оценивали с использованием моделей мышей с ксенотрансплантатом (фиг. 5). Авторы настоящего изобретения впервые создали клеточную линию Her3B-Luc23, которая стабильно экспрессирует люциферазу и, таким образом, позволила количественно оценить рост опухоли с использованием визуализации биолюминесценции *in vivo*. Мышам подкожно вводили данные Her3B-Luc23 клетки в правый бок, а затем разделили их на три группы с эквивалентной средней интенсивностью биолюминесценции опухоли перед внутривенными инъекциями антител (200 мкг G1A8 или антитела изотипического контроля), которые проводились два раза в неделю в течение четырех недель. Мониторинг роста опухоли с течением времени путем измерения объемов опухоли и относительной интенсивности биолюминесценции опухолевых клеток показал, что G1A8 значительно подавлял рост опухоли по сравнению с антителом изотипического контроля (фиг. 5A-5C).

Противоопухолевая эффективность против ксенотрансплантатной опухоли, образованной из трансплантированных Her3B-клеток дикого типа также была оценена. Терапия антителом была начата, когда объемы опухоли достигли примерно 100 мм³ в размерах. Мыши, являющиеся носителями Her3B, были разделены на три группы с эквивалентным средним объемом опухоли и получали внутривенную инъекцию антитела (200 мкг G1A8 или антитела изотипического контроля) два раза в неделю в течение трех недель. Как и в случае с вышеупомянутыми результатами для ксенотрансплантатов Her3B-Luc23, G1A8 значительно подавляет опухолевую прогрессию Her3B (фиг. 5D). Более того, терапия G1A8 значительно продлевала выживаемость мышей по сравнению с группой антитела изотипического контроля (фиг. 5E). HS29 проявлял сильную антипролиферативную активность, аналогичную таковой для G1A8 (фиг. 8C). Противоопухолевая активность HS29 была исследована на модели опухоли, полученной с использованием ксенотрансплантата пациента (фиг. 9A). Терапия HS29 была начата, когда средний объем опухоли составил примерно 150 мм³. У мышей, которые получали внутривенную инъекцию HS29 (10 мг/кг), отмечался подавленный рост опухоли по сравнению с мышами контрольной группы. Примечательно, что у мышей контрольной группы наблюдалось значительное снижение массы тела, поскольку опухоли продолжали расти, и две из погибли вследствие плохого физиологического состояния из-за прогрессирования опухоли; тогда как мыши, получавшие терапию HS29, сохраняли постоянную массу тела и оставались здоровыми (фиг. 9D). Эти данные подтверждают противоопухолевую активность HS29 как *in vitro*, так и *in vivo*.

Пример 6. Оценка безопасности на мышах и яванских макаках.

Было обнаружено, что антитело согласно настоящей заявке, а именно G1A8, не обладает перекрестной реактивностью с мышинным FGF15, ортологом человеческого FGF19, который обладает только 49% идентичностью аминокислот по отношению к FGF19 (T.J. Wright et al., *Dev. Biol.*, 269, 264-275 (2004)). Ввиду этого наблюдения вышеупомянутые модели мышей с опухолевым ксенотрансплантатом могут быть непригодными для оценки профилей безопасности терапии G1A8. Тем не менее, помня, что человеческий FGF19 может осуществлять свою функцию регуляции метаболизма желчных кислот у мышей через

мышинный FGFR4, подавляя транскрипцию CYP7A1 в печени (M. Zhou et al., 2014, выше; R. Goetz et al., 2007, выше) (фиг. 1C), эту мышиную модель использовали для оценки того, влияет ли G1A8 на транскрипцию CYP7A1 в печени. Неожиданно было обнаружено, что G1A8 не оказывает влияния на FGF19-индуцированную репрессию транскрипции CYP7A1 в печени (фиг. 4C), что указывает на то, что G1A8, по-видимому, не влияет на функцию регуляции метаболизма желчных кислот FGF19. Предыдущее исследование (Pai et al., *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 126, 446-456 (2012)) показало, что введение гуманизованного антитела к FGF19 (1A6) яванским макакам вызвало нарушение метаболизма желчных кислот вследствие нарушения функционирования FGF19 и увеличения экспрессии гена CYP7A1 с появлением клинических симптомов (снижение массы тела, низкое потребление пищи, тяжелая диарея) и, в конечном итоге, привело к внеплановой эвтаназии всех животных в группах лечения, где яванские макаки соответственно получали 10 и 30 мг/кг. Аминокислотные последовательности FGF19 яванских макак и человеческого FGF19 практически идентичны (идентичны 98% аминокислот). Авторы настоящего изобретения также проверили перекрестную реактивность антител по настоящей заявке и подтвердили, что G1A8 связывается как с FGF19 яванского макака, так и с человеческим FGF19 со сходной аффинностью связывания (фиг. 3A и 6L). Таким образом, яванские макаки были признаны хорошей моделью для оценки профиля безопасности G1A8, в частности, если он нарушает функцию регуляции метаболизма желчных кислот FGF19. Четыре яванские макаки, не получавшие прежде лечения, были рандомизированы в две группы, в одной из которых им внутривенно вводился контрольный физиологический раствор, а в другой - 10 мг/кг G1A8 в день 1 и 30 мг/кг G1A8 в день 16. Каждая группа включала одного самца и одну самку. Образцы крови собирали на протяжении всего исследования (фиг. 6A). Все обезьяны завершили лечение двумя дозами G1A8, и ни у одной из них не было обнаружено каких-либо клинических побочных эффектов, которые были описаны для 1A6 (который связывается с С-концом FGF19), включая снижение массы тела, низкое потребление пищи, жидкий стул или диарею (фиг. 6B). Предыдущее исследование терапии 1A6 (с однократным приемом) на обезьянах сообщало о заметной повышении в сыворотке крови общего уровня желчных кислот, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) (Pai et al., *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 126, 446-456 (2012)). Несмотря на то что у обезьян в группе терапии G1A8 первоначально выявили небольшое увеличение общего уровня желчных кислот в сыворотке крови на день 15 (1-ая временная точка тестирования) после лечения G1A8 (10 мг/кг), дальнейшего увеличения после второго введения, когда вводилась более высокая доза (30 мг/кг), на день 16 не наблюдалось; наоборот, наблюдалось снижение данного показателя (фиг. 6C). Данный результат свидетельствует о том, что небольшое увеличение уровня желчных кислот в сыворотке крови, наблюдаемое на день 15, вероятно, можно объяснить нормальными физиологическими изменениями данного показателя у животных. Не было выявлено значительной разницы в уровне общего билирубина, аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) у обезьян, которые получали контрольный физиологический раствор, и у обезьян, которые получали G1A8, что свидетельствует об отсутствии повреждения печени, вызванного введением G1A8 (фиг. 6, 3-й).

Авторы настоящего изобретения также собрали образцы тканей обезьян из органов (печень, подвздошная кишка и почки), которые отвечают за рециркуляцию желчных кислот, для оценки уровня экспрессии нескольких генов, которые, как известно, влияют на метаболизм желчных кислот (фиг. 6D-6F). В печени животных, получавших G1A8, не было обнаружено увеличения экспрессии гена CYP7A1, а экспрессия других генов, которые, как известно, кодируют белки-переносчики желчных кислот, не показала значительного увеличения по сравнению с животными в контрольной группе (фиг. 6D). В почках и подвздошной кишке экспрессия генов переносчиков желчных кислот не различалась между группой, обработанной G1A8, и контрольной группой (фиг. 6F, 6G), что указывает на то, что рециркуляция и метаболизм желчной кислоты поддерживались на нормальном физиологическом уровне. Временные графики средней концентрации для двух разных доз G1A8 показали одинаковый конечный период полувыведения G1A8, составляющий 174,29 и 188,38 ч у яванских макак, получавших дозу 10 и 30 мг/кг соответственно (фиг. 6J и 6K).

Все эти эксперименты на яванских макаках по оценке безопасности не выявили токсичности, связанной с воздействием на метаболизм желчных кислот, ассоциированной с введением G1A8, и, таким образом, было выдвинуто предположение, что лечение G1A8 в терапевтических условиях, вероятно, не приведет к развитию значительной мальабсорбции желчных кислот или другим побочным эффектам, связанным с метаболизмом желчных кислот.

Пример 7. Структурный анализ комплекса FGF19-G1A8.

Структура Fab-версии G1A8 в комплексе с FGF19 была определена с использованием метода рентгеновской кристаллографии с разрешением 2.6, чтобы понять молекулярные основы взаимодействия между антителом согласно настоящей заявке и FGF19. Для этого анализа было выбрано антитело G1A8.

Структура была определена с помощью метода молекулярного замещения и уточнена ($R_{\text{work}}/R_{\text{free}}=0,216/0,278$), ее геометрические свойства были определены как хорошие. В структуре FGF19 и G1A8 были смоделированы остатки 37-172 FGF19 с четко определенной электронной плотностью. Структура FGF19 и G1A8 демонстрирует внешне идеальную комплементарность формы, занимая общую пло-

щадь 983 Å². Площадь скрытой поверхности для переменных доменов тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) G1A8 практически идентична (495 и 488 Å²). Большинство остатков, составляющих эпитоп G1A8, являются N-концами FGF19 и находятся внутри фрагмента SEQ ID NO: 2, состоящего из аминокислотных остатков 38-45 SEQ ID NO: 1, который расположен выше щели между VH и VL (фиг. 7A и 7C). Это открытие согласуется с разработанным свойством G1A8, заключающимся в специфическом направленном воздействии на N-конец FGF19, как написано выше.

Таблица 1

Данные кристаллографии

	FGF19-G1A8 Fab
Набор данных	
Длина волны (Å)	0.9789
Пространственная группа	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Параметры элементарной ячейки	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	85.0, 104.1, 165.4
α , β , γ (°)	90.0, 90.0, 90.0
Разрешение (Å)	48.73 – 2.6 (2.69 – 2.60)
Полнота (%)	99.7 (99.0)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	24.3 (3.3)
CC _{1/2} (%)	99.7 (95.2)
R _{merge} (%)	1.7(14.5)
Множественность	2.0 (2.0)
Оптимизация	
Разрешение (Å)	48.7 – 2.6 (2.66 – 2.60)
Копий	45834 (3207)
R _{work} /R _{free}	20.0 / 25.2 (35.1/40.1)
Атомов	8740
Фактор Дебая-Валлера (Å ²)	63.9
Среднеквадратичное отклонение	
Длина связи	0.005
Валентный угол	0.833
Карта Рамачандрана	
Процент остатков в предпочитаемой области	96.37%
Процент остатков в допустимой области	3.63%
Полные маргинальные остатки	0

* Значения в скобках указаны для высшего электронного уровня.

Если говорить предметно, восемь остатков из положений 38-45 FGF19 участвуют в обширных взаимодействиях со всеми шестью петлями областей, определяющих комплементарность, как из VH, так и из VL G1A8 через сочетание гидрофобных и полярных контактов, как показано на фиг. 2 и табл. 2. Боко-

вая цепь остатка Трп38 FGF19 на N-конце закорена в гидрофобном кармане, образованном Ала33, Сер52, Сер57, Тир59, Гли102 и Лей104 из HCDR1-3, в то время как Арг46 FGF19 на другой стороне принимает участие в взаимодействиях по типу "солевого мостика" с Глу103 и Асп52 из HCDR3 и LCDR2, соответственно (фиг. 7C). Было показано, что мутант FGF19/Трп38Ала обладает сниженной аффинностью связывания по отношению к G1A8, и мутация Арг45 на Ала привела к полной потере связывания (фиг. 7D), что подтверждает важность данных взаимодействий. Арг45 FGF19 также создает дополнительное взаимодействие водородных связей с Асп100 из HCDR3 (фиг. 7C). Родственное антителу G1A8 антитело 31A3 имеет Вал в этом же положении, вероятно, эта разница обуславливает более низкую аффинность 31A3, чем G1A8 (фиг. 2 и 3A). Структура комплекса G1A8-FGF19 также показала, что остатки 168-172 FGF19 на С-конце находятся в непосредственной близости с N-концом на границе взаимодействия FGF19 и G1A8. Структура комплекса G1A8 FGF19 также показала, что остатки 168-172 FGF19 на С-конце находятся в непосредственной близости с N-концом на границе взаимодействия FGF19 и G1A8. Остаток Лей169 FGF19 на С-конце на одной линии с N-концом формирует гидрофобное взаимодействие с Тир51 и Про57 из LCDR2. Водородная связь между Тир51 и карбонильной группой каркаса FGF19/Про167 далее стабилизирует С-концевое взаимодействие FGF19. Замена Лей169 на Ала приводит к снижению аффинности связывания по отношению к антителу вследствие увеличения скорости диссоциации (фиг. 7D).

Таблица 2

Контактные остатки между G1A8 и FGF19

G1A8	HCDR1		HCDR2		HCDR3				LCDR3	LCDR2			LCDR3	
	A33	S52	S57	N100	W101	Q102	E103	L104		Y34	Y51	D52	P57	W93
FGF19	W38	W38	W38	<u>R45</u>	I42, L44, <u>E81</u>	W38, I42	<u>R45</u>	W38	P41, R43	R45, <u>P167</u> L169	R45	L169	P41	<u>D40</u>

* Контактные остатки с межатомным расстоянием менее 4 Å суммированы. Подчеркнутые остатки участвуют в формировании водородных связей или солевого мостика.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с человеческим фактором роста фибробластов 19 (FGF19), содержащие любое из (а), (б) и (в):

(а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

(б) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; или

(в) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, 15 или 20.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие вариабельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, 16 или 21.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие

(а) вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и

вариабельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10;

(б) вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16; или

(в) вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащий

(а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;

(б) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; или

(в) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, 17 или 22.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие легкую цепь, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, 18 или 23.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие

(а) тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12;

(б) тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18; или

(в) тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие

(а) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

(б) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;

(с) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, в котором антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечный Fv (scFv) или Fv, стабилизированный дисульфидом (dsFv).

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

(I) связывается с человеческим FGF19 со значением K_D , составляющим от примерно 1×10^{-9} М до примерно 1×10^{-12} М, определенным методом поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или подобным методом;

(II) вступает в перекрестную реакцию с FGF19 яванского макака;

(III) блокирует связывание человеческого FGF19 с человеческим FGFR4 и/или с человеческим комплексом FGFR4-KLB;

(IV) подавляет FGF19-индуцированную клеточную пролиферацию;

(V) не влияет или минимально влияет на FGF19-подавленную экспрессию CYP7A1; и

(VI) не нарушает или незначительно нарушает гомеостаз желчных кислот, поддерживаемый FGF19.

12. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотид, который кодирует антите-

ло или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11.

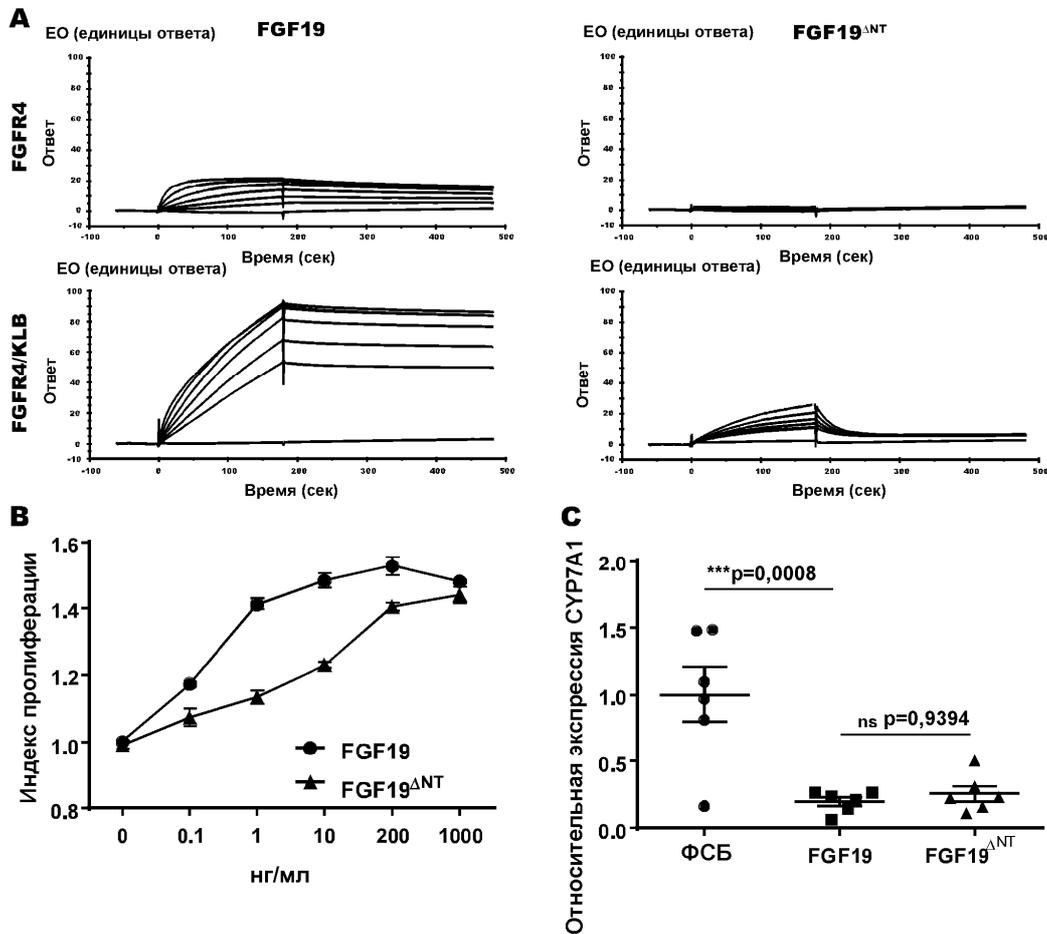
13. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

14. Способ профилактики или лечения заболевания или нарушения, вызванного или связанного с аномальной передачей сигнала FGF19-FGFR4, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11 или фармацевтической композиции по п.13.

15. Способ профилактики рецидивирования заболевания или нарушения, вызванных или связанных с аномальной передачей сигнала FGF19-FGFR4, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11 или фармацевтической композиции по п.13.

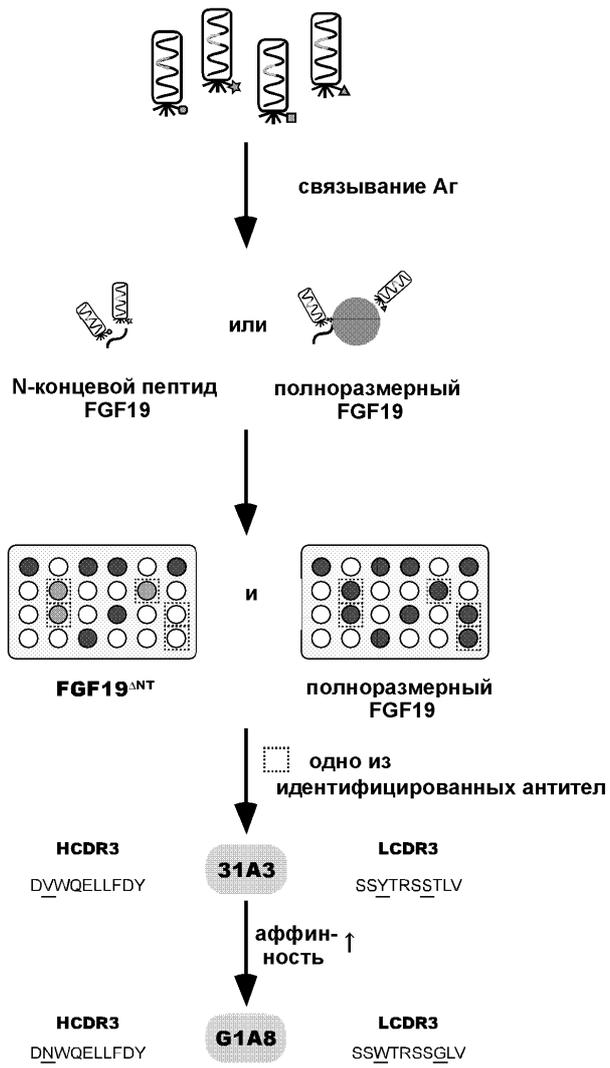
16. Способ по п.14 или 15, в котором заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование, вызванное или связанное с аномальной передачей сигнала FGF19-FGFR4.

17. Способ по п.16, в котором злокачественным новообразованием является гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК).

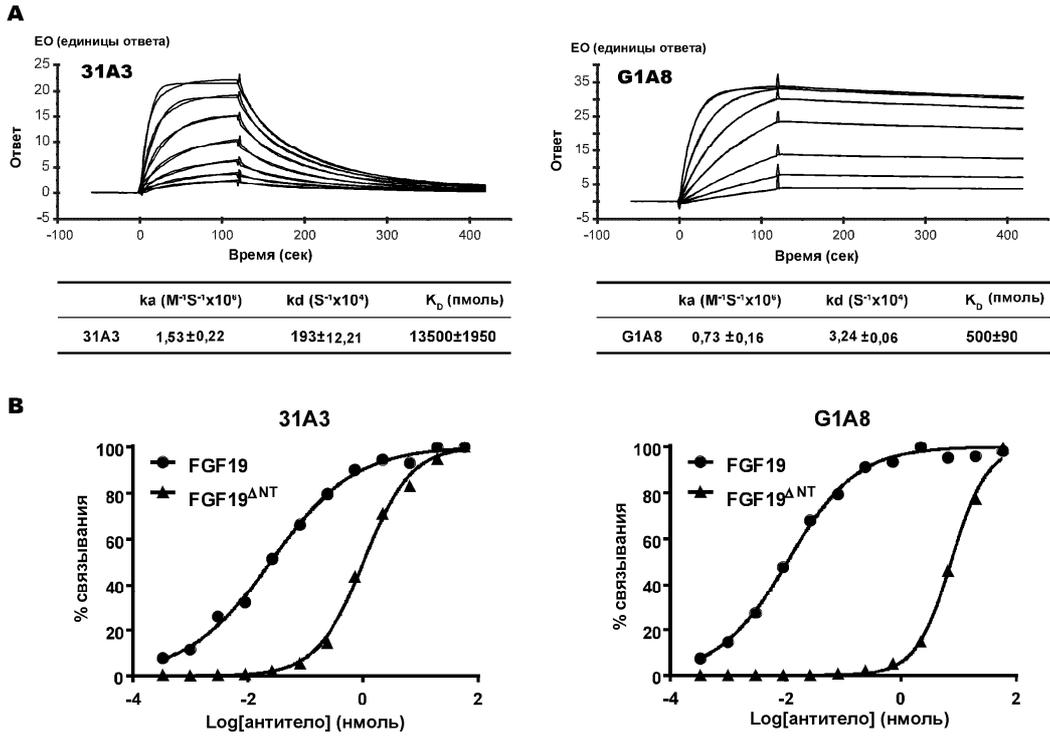


Фиг. 1

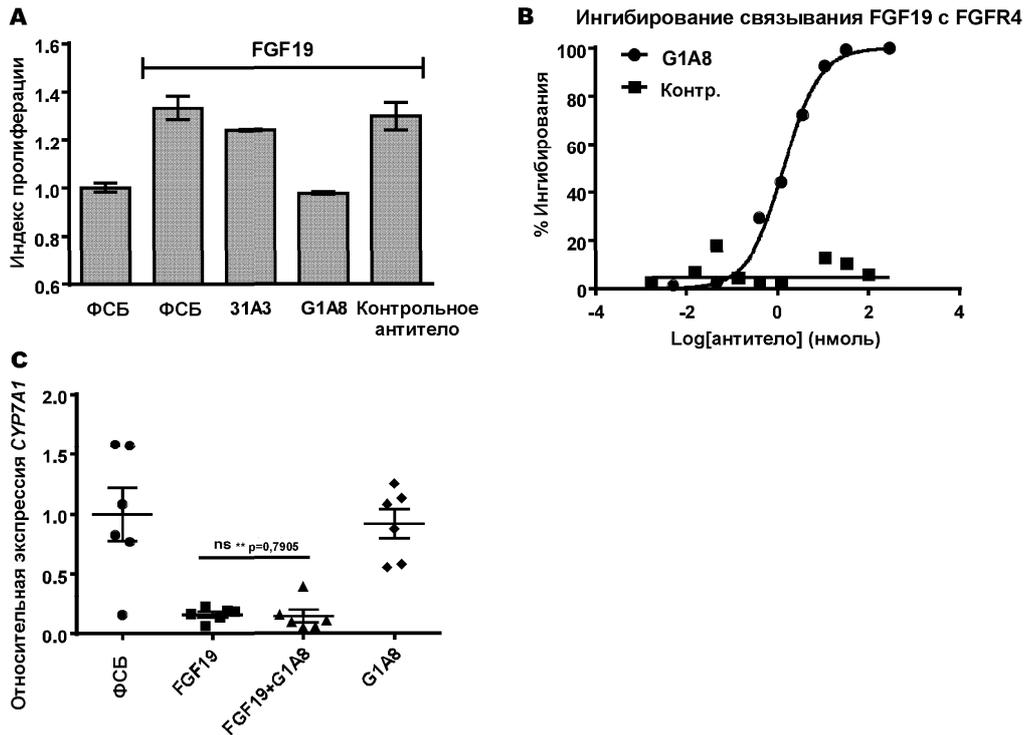
фаг-дисплейная библиотека антител



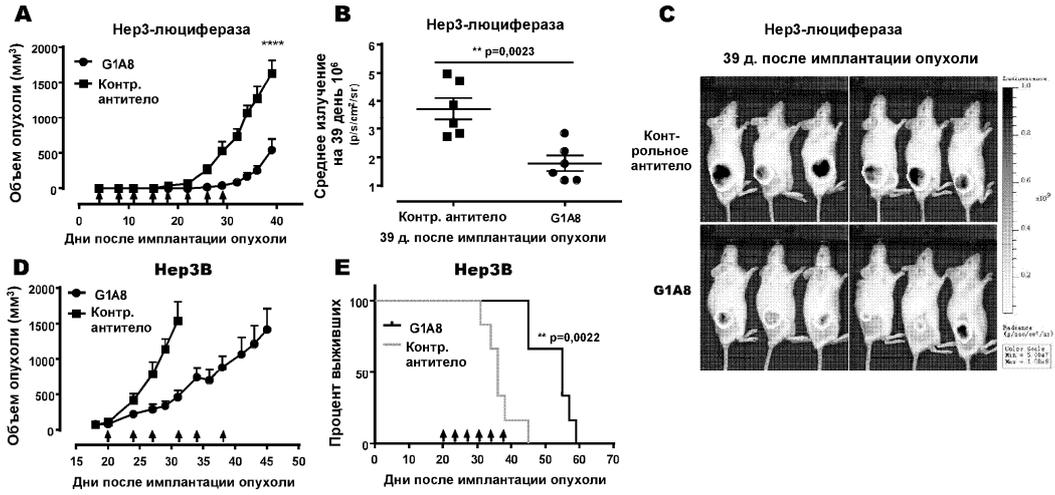
Фиг. 2



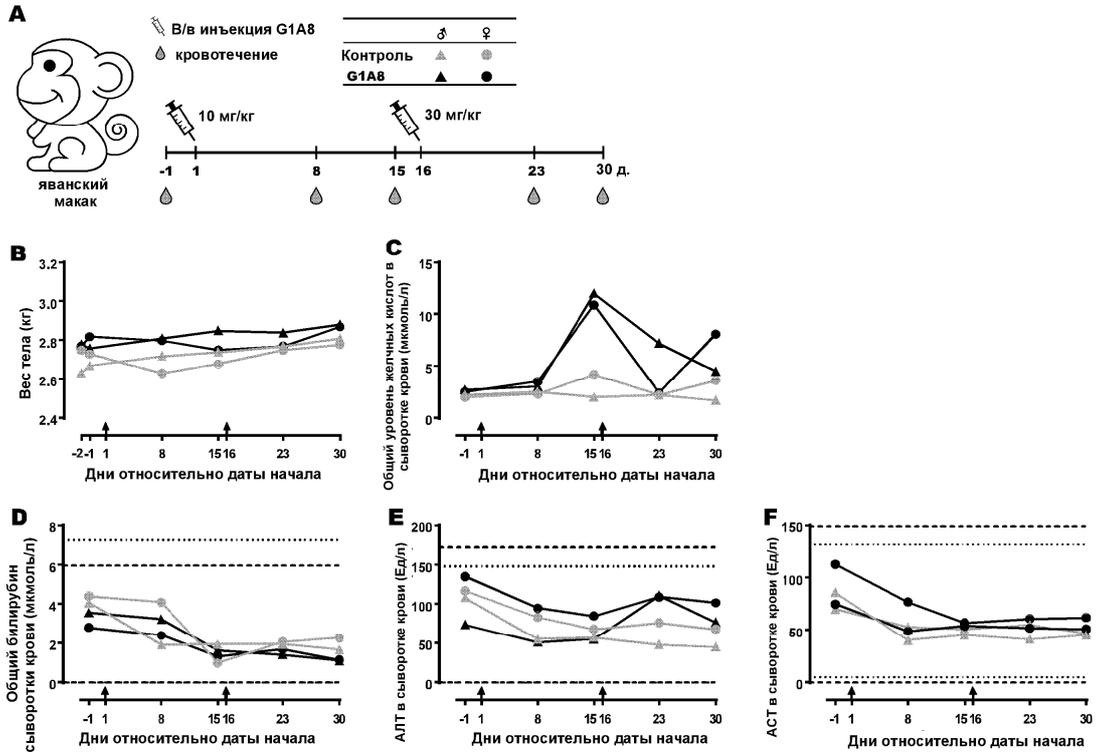
Фиг. 3



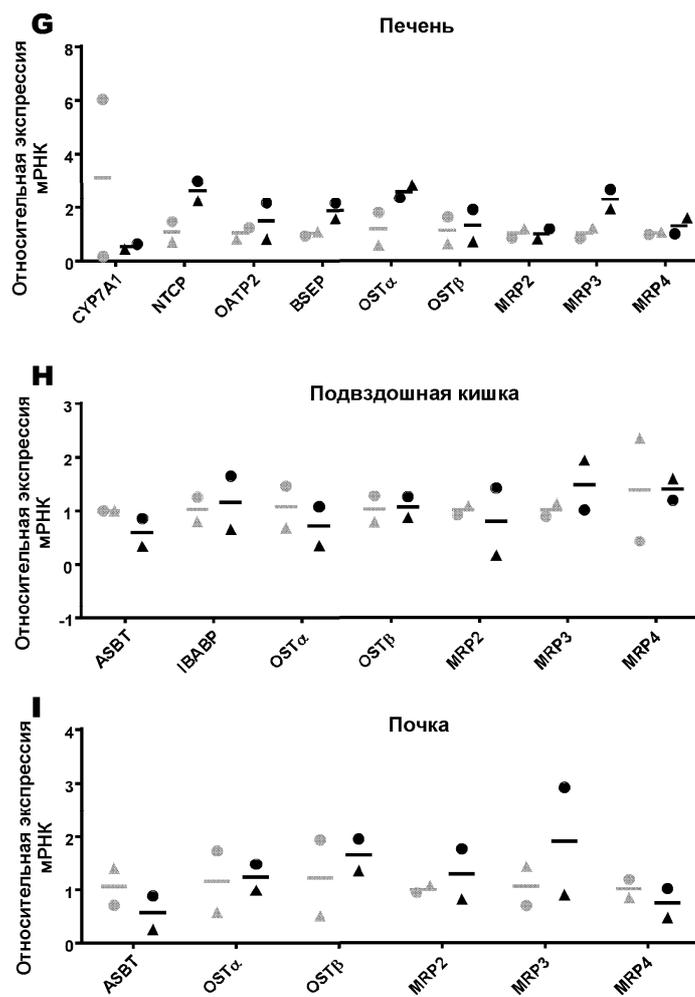
Фиг. 4



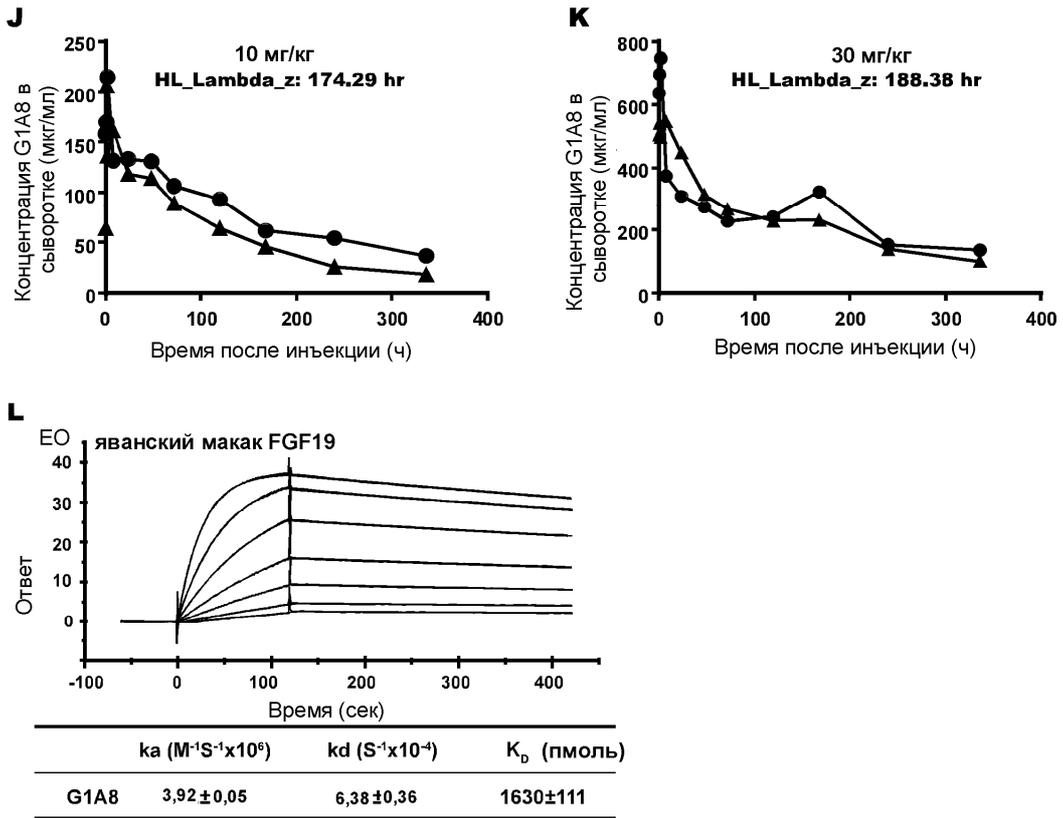
Фиг. 5



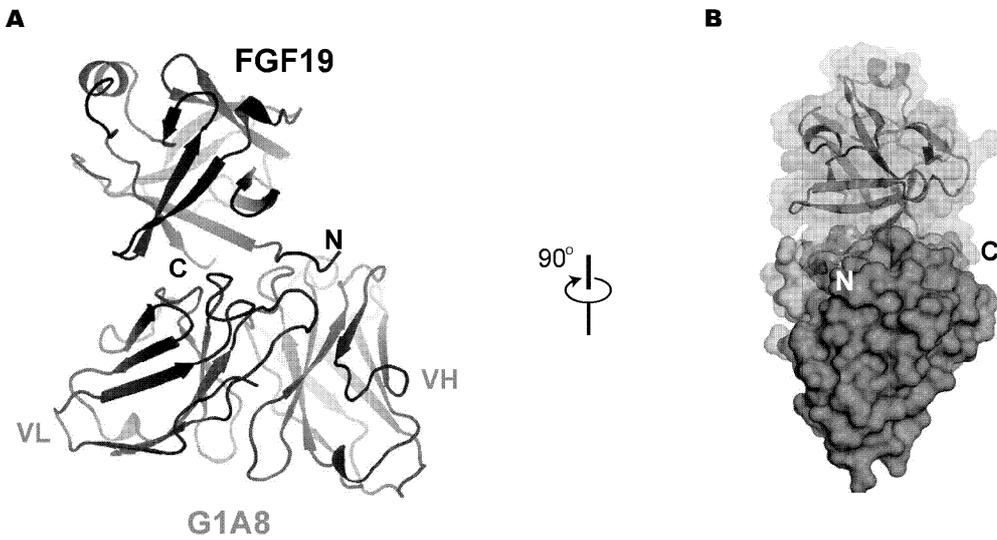
Фиг. 6



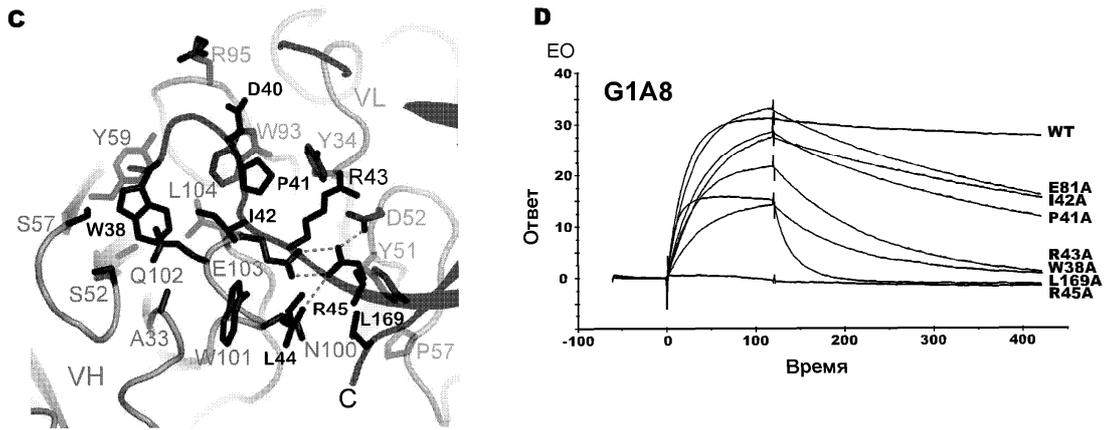
Фиг. 6 (продолжение)



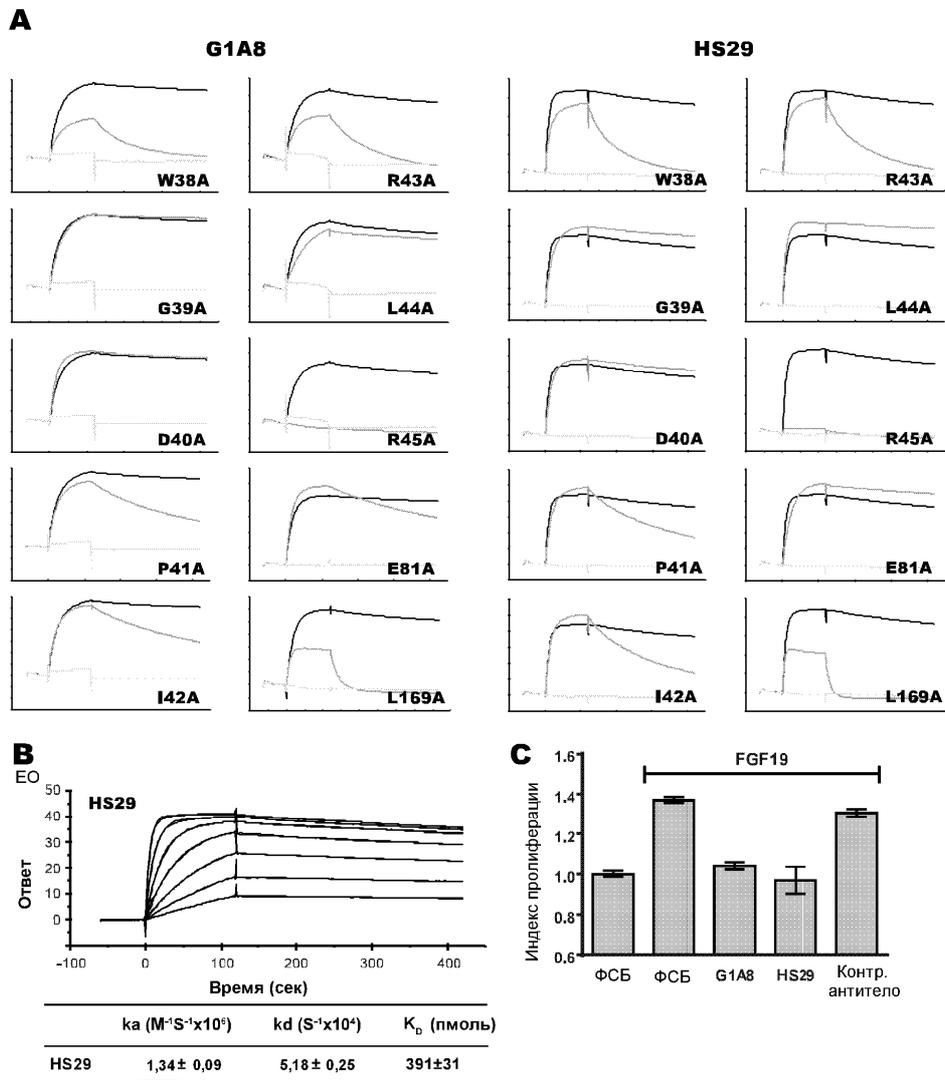
Фиг. 6 (продолжение)



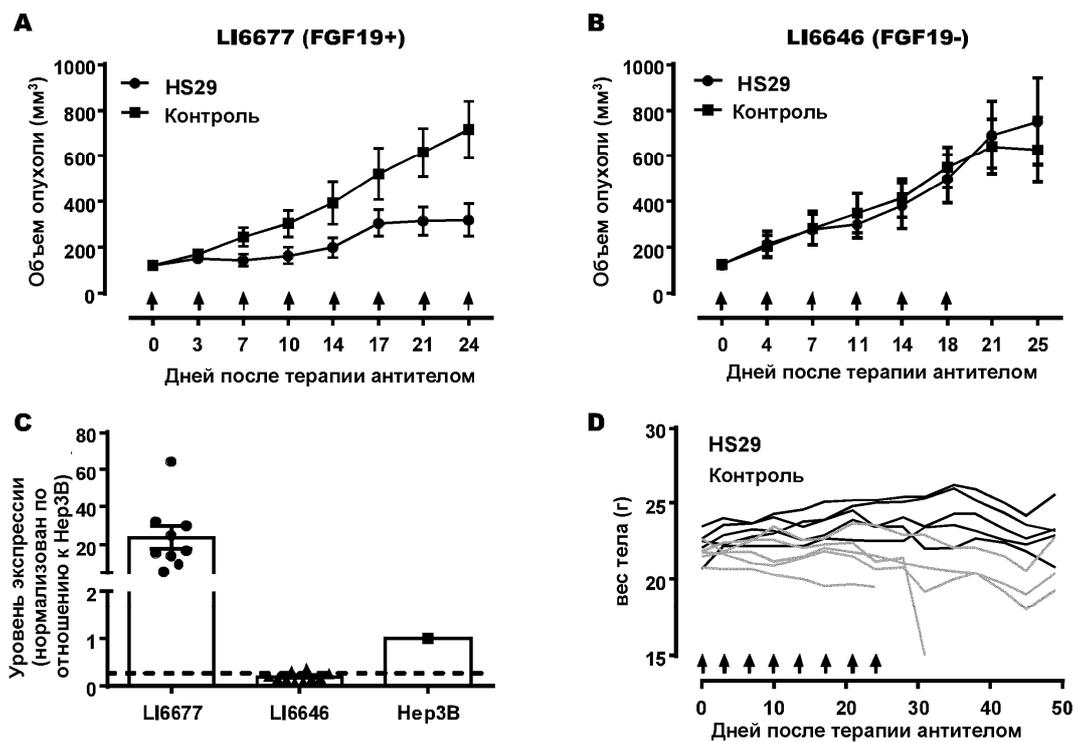
Фиг. 7



Фиг. 7 (продолжение)



Фиг. 8



Фиг. 9

