

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491414** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.08.02

(51) Int. Cl. *A61P 9/02* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.12.06

(54) **АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИ-NPR1 АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **63/286,476; 63/310,078**

(32) **2021.12.06; 2022.02.14**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/081031**

(87) **WO 2023/107957 2023.06.15**

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

Данн Майкл, Мортон Лори (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые связываются с белком рецептора натрийуретического пептида 1 (NPR1), и способам их применения. В различных вариантах осуществления изобретения антитела представляют собой полностью человеческие антагонистические антитела, которые связываются с NPR1. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению пригодны для блокирования сигнального пути и/или активности NPR1, обеспечивая тем самым средства лечения или профилактики NPR1-ассоциированного заболевания, расстройства или состояния, включая гипотензию, у людей.

**202491414
A1**

202491414

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581236EA/085

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИ-NPR1 АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Настоящая заявка подана 6 декабря 2022 г. в виде международной заявки на патент РСТ и заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 63/286476, поданной 6 декабря 2021 г., и 63/310078, поданной 14 февраля 2022 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Список последовательностей

[002] Данная заявка содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате XML. XML-файл списка последовательностей включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанный XML-файл, созданный 24 ноября 2022 г., имеет название 40848_0112WOU1_SL.xml и имеет размер 82654 байта.

Область техники

[003] Настоящее изобретение относится к антагонистическим антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые специфически связываются с рецептором натрийуретического пептида 1 (NPR1), и к терапевтическим и диагностическим способам применения данных антител.

Уровень техники

[004] Рецептор натрийуретического пептида 1 (NPR1; также известный как NPR-A) представляет собой мембраносвязанную гуанилатциклазу, которая опосредует внутриклеточное превращение гуанозинтрифосфата в циклический гуанозинмонофосфат (сGMP) (Martinez-Rumayor et al., 2008, Am. J. Cardiol., 101(3a):3-8). NPR1 широко экспрессируется, в том числе в почках, легких, надпочечниках, сосудистой системе, головном мозге, печени, эндотелиальной и жировой тканях, и на более низких уровнях в сердце. Он активируется путем связывания с предсердным натрийуретическим пептидом (ANP) или мозговым натрийуретическим пептидом (BNP). Активация и передача сигналов NPR1 стимулируют многие физиологические реакции, затрагивающие многие ткани. Система ANP-NPR1 хорошо изучена в отношении ее роли в вазорелаксации, натрийурезе, диурезе, проницаемости эндотелия, а также в несердечно-сосудистых функциях, таких как липолиз и функции иммунных клеток (Potter, 2011, Pharmacol. Ther., 130: 71-82). Агонизм NPR1 приводит к изменениям системного артериального давления (BP) за счет сGMP-опосредованных эффектов на внутрисосудистый объем, вазорелаксацию, натрийурез и диурез.

[005] Моноклональные антитела к NPR1 были впервые описаны Kitano et al., в 1995 г. (Immunol. Lett., 47: 215-22). Активирующие или агонистические анти-NPR1 антитела раскрыты, например, в патентах/патентных публикациях США № 9090695, 20160168251 и 20200123263, и в WO2010065293.

[006] Гипотензия или низкое кровяное давление, может быть относительно

доброкачественным, бессимптомным состоянием, но она может вызывать беспокойство, когда давление нагнетания недостаточно для перфузии ключевых органов оксигенированной кровью (Sharma et al., обновлено в 2021 г., доступно на <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499961/>). Осложнения при нелеченной гипотензии с плохим сердечным выбросом являются серьезными и могут даже привести к смерти.

[007] Заболевания, характеризующиеся гипотензией, вызывают высокую неудовлетворенную медицинскую потребность в безопасной терапии длительного действия. Относительно немногие препараты повышают артериальное давление и внутрисосудистый объем. Большинство существующих препаратов имеют ограничения, например, пероральные препараты имеют короткую продолжительность действия, в результате чего требуется многократный прием в день, а внутривенные вазопрессоры требуют инфузии в отделении интенсивной терапии с частым контролем за счет узкого терапевтического индекса.

Сущность изобретения

[008] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антагонистическим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с белком рецептора натрийуретического пептида 1 (NPR1). В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с белком рецептора натрийуретического пептида 1 (NPR1), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с NPR1 и блокируют NPR1. В дополнительном варианте осуществления блокирование NPR1 включает ингибирование и/или блокирование передачи сигналов и/или активности NPR1. В некоторых вариантах осуществления анти-NPR1 антитела представляют собой полностью человеческие антитела, которые связываются с NPR1 с высокой аффинностью и блокируют NPR1. Антитела по настоящему изобретению пригодны, среди прочего, для блокирования или ослабления сигнального пути NPR1 и/или гипотензивной активности белка NPR1. В некоторых вариантах осуществления антитела пригодны для профилактики, лечения или облегчения, по меньшей мере, одного симптома или признака NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства, включая гипотензию, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить профилактически или терапевтически субъекту, имеющему или имеющему риск развития NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства. В конкретных вариантах осуществления антитела используются для повышения системного артериального давления у субъекта, страдающего низким кровяным давлением. Такие антитела можно использовать в качестве терапии расстройства или патологического состояния, ассоциированного с гипотензией, при введении субъекту, нуждающемуся в этом.

[009] Антагонистические антитела, раскрытые в настоящем документе, связываются с NPR1 с высокой аффинностью и обладают улучшенными фармакокинетическими свойствами (по сравнению с лекарственными средствами, используемыми в соответствии со стандартами лечения). Однократная доза антитела по настоящему изобретению

приводила к устойчивому повышению кровяного давления. Действительно, антитела, описанные здесь, эффективны в повышении кровяного давления и поддержании повышенного давления в течение 28 суток при введении в однократной дозе. Такие антитела можно использовать для обеспечения высокой эффективности наряду с менее частым введением у субъекта с NPR1-ассоциированным заболеванием или расстройством (например, гипотензией).

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

[011] В первом аспекте настоящее изобретение относится к выделенным рекомбинантным моноклональным антагонистическим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с NPR1.

[012] В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой полностью человеческие моноклональные антитела.

[013] Типичные анти-NPR1 антитела по настоящему изобретению приведены в таблицах 1 и 2 настоящего документа. В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), участков, определяющих комплементарность тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и участков, определяющих комплементарность легкой цепи (LCDR) (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) типичных антител. В таблице 2 представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 типичных антител.

[014] Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, или по существу сходную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

[015] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1, или по существу сходную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

[016] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим переменную область тяжелой цепи

(HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 38 и 55.

[017] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим переменную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 46 и 63.

[018] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим три участка, определяющих комплементарность (CDR), содержащихся в переменной области тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 38 и 55; и три CDR, содержащихся в переменной области легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 46 и 63.

[019] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из типичных анти-NPR1 антител, приведенных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID NO: 2/10 (например, mAb38067), 22/30 (например, mAb38072), 38/46 (например, mAb38090) и 55/63 (например, mAb22034).

[020] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, имеющую не более двенадцати аминокислотных замен, и/или указанную LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, имеющую не более десяти аминокислотных замен. Например, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, где указанная аминокислотная последовательность имеет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать аминокислотных замен. В другом примере настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, где указанная аминокислотная последовательность содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-NPR1 антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим

HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, где указанная аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, одну аминокислотную замену, и/или указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, где указанная аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, одну аминокислотную замену.

[021] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[022] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[023] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[024] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[025] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[026] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в таблице 1, или по существу сходную с ней

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

[027] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим:

(a) участок, определяющий комплементарность тяжелой цепи (HCDR)1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 40 и 57;

(b) участок HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 42 и 59;

(c) участок HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 28, 44 и 61;

(d) участок, определяющий комплементарность легкой цепи (LCDR)1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 48 и 65;

(e) участок LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AAS и GAS; и

(f) участок LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32 и 69.

[028] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из типичных анти-NPR1 антител, приведенных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16 (например, mAb38067), 28/32 (например, mAb38072), 44/16 (например, mAb38090) и 61/69 (например, mAb22034).

[029] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, приведенной в таблице 1, на 1 аминокислоту, HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, приведенной в таблице 1, на 1 аминокислоту, и HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, приведенной в таблице 1, на 1 аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная LCVR

содержит LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, приведенной в таблице 1, на 1 аминокислоту, LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, приведенной в таблице 1, на 1 аминокислоту, и LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, приведенной в таблице 1, на 1 аминокислоту. Например, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 24 на 1 аминокислоту, HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 26 на 1 аминокислоту, и HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 28 на 1 аминокислоту. В еще одном примерном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная LCVR содержит LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 12 на 1 аминокислоту, LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность AAS или аминокислотную последовательность, отличающуюся от AAS на 1 аминокислоту, и LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 32 на 1 аминокислоту.

[030] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим совокупность из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из типичных антител, приведенных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления совокупность аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 6-SEQ ID NO: 8-SEQ ID NO: 12-AAS-SEQ ID NO: 16 (например, mAb38067), SEQ ID NO: 24-SEQ ID NO: 26-SEQ ID NO: 28-SEQ ID NO: 12-AAS-SEQ ID NO: 32 (например, mAb38072), SEQ ID NO: 40-SEQ ID NO: 42-SEQ ID NO: 44-SEQ ID NO: 48-AAS-SEQ ID NO: 16 (например, mAb38090) и SEQ ID NO: 57-SEQ ID NO: 59-SEQ ID NO: 61-SEQ ID NO: 65-GAS-SEQ ID NO: 69 (например, mAb22034).

[031] В родственном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим совокупность из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено любым из типичных антител, приведенных в таблице 1. Например, настоящее описание включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие совокупность аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащихся в

паре с аминокислотными последовательностями HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16 (например, mAb38067), 28/32 (например, mAb38072), 44/16 (например, mAb38090) и 61/69 (например, например, mAb22034). В родственном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей переменной области тяжелой цепи (HCVR)/переменной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 38/46 и 55/63.

[032] Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут использоваться для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Примерные соглашения, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают, например, определение Kabat, определение Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение Kabat основано на изменчивости последовательности, определение Chothia основано на расположении областей структурной петли, и определение AbM является компромиссом между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.* 273: 927-948 (1997); и Martin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9268-9272 (1989). Также доступны общедоступные базы данных для идентификации последовательностей CDR внутри антитела.

[033] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с NPR1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где легкая цепь выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 36, 53 и 73.

[034] В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с NPR1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 34, 51 и 71; и легкая цепь выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 36, 53 и 73.

[035] В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с NPR1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с остатками в нижней доле внеклеточного домена NPR1. В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с NPR1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют, по меньшей мере, с одним из остатков NPR1, выбранных из группы, состоящей из Arg143, Leu144, Glu384, Leu401, Val402, Ala103, Ser405, Gly406, Arg407, Lys408, Trp411, Leu413, Gly414, Tyr415 и Pro416.

[036] В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с NPR1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[037] В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с NPR1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

[038] В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с NPR1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

[039] В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с NPR1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71; и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

[040] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с NPR1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три участка, определяющих комплементарность (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), где HCVR содержит: (i) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 38 и 55; (ii) аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 38 и 55; (iii) аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 38 и 55; или (iv) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 38 и 55, где указанная аминокислотная последовательность имеет не более 12 аминокислотных замен; и LCVR содержит: (a) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 46 и 63; (b) аминокислотную

последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 46 и 63; (с) аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 46 и 63; или (d) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 46 и 63, где указанная аминокислотная последовательность имеет не более 10 аминокислотных замен.

[041] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с NPR1 антагонистическим образом, т.е. блокируют или снижают связывание и/или активность NPR1.

[042] Настоящее изобретение относится к анти-NPR1 антителам, имеющим модифицированный характер гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть полезна модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело, в котором отсутствует фукозный фрагмент, присутствующий в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC, 277:26733). В других применениях можно провести модификацию галактозилирования для изменения комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

[043] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые проявляют pH-зависимое связывание с NPR1. Например, настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с NPR1 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при основном pH (т.е. проявляют сниженное связывание при основном pH).

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

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

[046] Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с тем же эпитопом, что и референтное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие три CDR HCVR и три CDR LCVR, где каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную

последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, приведенных в таблице 1.

[047] В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению являются биспецифическими, включающими первую специфичность связывания с первым эпитопом NPR1 и вторую специфичность связывания со вторым эпитопом NPR1, где первый и второй эпитопы являются различными и неперекрывающимися.

[048] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антагонистическому анти-NPR1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют одну или более из следующих характеристик: (a) является полностью человеческим моноклональным антителом; (b) связывается с NPR1 человека при 25°C и при 37°C с константой диссоциации (K_D) ниже 1,7 нМ, как определено методом поверхностного плазмонного резонанса; (c) связывается с NPR1 обезьяны при 25°C и 37°C с K_D ниже 1,99 нМ, как определено методом поверхностного плазмонного резонанса; (d) связывается с NPR1 человека в присутствии ANP при 25°C и при 37°C с K_D ниже 1,52 нМ, как определено методом поверхностного плазмонного резонанса; (e) ингибирует индуцированную лигандом активацию NPR1 (например, индуцированную ANP или BNP), как определено анализом накопления cGMP; (f) связывается с NPR1 человека в присутствии или в отсутствии ANP или BNP с EC_{50} ниже 2,9 нМ, как определено иммуноанализом на основе электрохемилюминесценции; (g) связывается с NPR1 обезьяны в присутствии или в отсутствии ANP или BNP с EC_{50} ниже 4,2 нМ, как определено иммуноанализом на основе электрохемилюминесценции; (h) повышает системное артериальное давление (включая систолическое, диастолическое, среднее артериальное и пульсовое давление) при введении мышам с нормальным давлением и мышам с гипотензией, где повышение системного артериального давления сохраняется примерно до 28 суток после введения однократной дозы; (i) повышает системное артериальное давление при введении мышам с гипотензией, индуцированной сверхэкспрессией ANP, где повышение системного артериального давления сохраняется примерно до 28 суток после введения однократной дозы; (j) повышает системное артериальное давление у мышей с гипотензией, индуцированной LPS; и (k) содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности HCVR, приведенной в таблице 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1.

[049] Во втором аспекте настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим анти-NPR1 антитела или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенной полинуклеотидной молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует переменную область тяжелой цепи (HCVR) выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с белком

рецептора натрийуретического пептида 1 (NPR1), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с NPR1 и блокируют NPR1. В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенной полинуклеотидной молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует переменную область легкой цепи (LCVR) выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с белком рецептора натрийуретического пептида 1 (NPR1), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с NPR1 и блокируют NPR1. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, приведенных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[050] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, приведенных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[051] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, приведенных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[052] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, приведенных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[053] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей

нуклеиновой кислоты HCDR3, приведенных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[054] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, приведенных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[055] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, приведенных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[056] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, приведенных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности.

[057] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, где HCVR содержит совокупность из трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), где совокупность аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является такой, как определено любым из типовых антител, приведенных в таблице 1.

[058] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, где LCVR содержит совокупность из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), где совокупность аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является такой, как определено любым из типовых антител, приведенных в таблице 1.

[059] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, и где LCVR содержит любую аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, приведенных в таблице 2, или по существу сходную с ней последовательность,

имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, приведенных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления согласно этому аспекту изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где обе HCVR и LCVR происходят из одного и того же анти-NPR1 антитела, приведенного в таблице 1.

[060] В родственном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотидную молекулу, кодирующую HCVR выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с белком рецептора натрийуретического пептида 1 (NPR1), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с NPR1 и блокируют NPR1. В другом родственном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотидную молекулу, кодирующую LCVR выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с белком рецептора натрийуретического пептида 1 (NPR1), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с NPR1 и блокируют NPR1. В еще одном родственном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантным экспрессионным векторам, способным экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой и/или легкой цепи антитела. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, указанных выше, т.е. молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, приведенных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к экспрессионным векторам, содержащим: (a) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HCVR антитела, которое связывается с NPR1, где HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в таблице 1; и/или (b) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую LCVR антитела, которое связывается с NPR1, где LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в таблице 1. Также в объем настоящего изобретения включаются клетки-хозяева, содержащие вектор по изобретению, а также способы получения антител или их участков посредством культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продукцию антител или фрагментов антител, и выделение продуцированных таким образом антител и фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления способ получения по изобретению дополнительно включает формуляцию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в виде фармацевтической композиции, содержащей приемлемый носитель. В некоторых

вариантах осуществления клетки-хозяева содержат клетку млекопитающего или прокариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (СНО) или клетку *Escherichia coli* (*E. coli*). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, где способы включают введение в клетку-хозяина экспрессионного вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HCVR и/или LCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, операбельно связанную с промотором; культивирование клетки-хозяина в условиях, благоприятных для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты; и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуральной среды и/или клетки-хозяина. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно очистить с использованием любого из способов, известных в уровне техники.

[061] В третьем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком рецептора натрийуретического пептида 1 (NPR1), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с NPR1 и блокируют NPR1, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество, по меньшей мере, одного рекомбинантного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с NPR1, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-NPR1 антитела и второго терапевтического агента или способа лечения. В одном варианте осуществления второй терапевтический агент или способ лечения представляет собой любой агент или способ лечения, который выгодно комбинируется с анти-NPR1 антителом. Типичные агенты или способы лечения, которые можно выгодно комбинировать с антагонистическим анти-NPR1 антителом, включают, помимо прочего, другие агенты, которые связывают и/или блокируют передачу сигнала и/или активность NPR1 (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), и/или агенты, которые не связываются напрямую с NPR1, но, тем не менее, способствуют лечению или ослаблению, по меньшей мере, одного симптома или признака NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства (раскрытого в других местах настоящего документа). Дополнительные комбинированные способы лечения и совместные составы, включающие анти-NPR1 антитела по настоящему изобретению, раскрыты в других местах настоящего документа.

[062] В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к терапевтическим способам лечения NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства у субъекта с использованием анти-NPR1 антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению, где терапевтические способы включают введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество

антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по изобретению, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления подлежащим лечению расстройством является любое заболевание или состояние, которое ослабляется, облегчается, ингибируется или предотвращается посредством блокирования активности NPR1 (например, гипотензия). В некоторых вариантах осуществления NPR1-ассоциированное заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из гипотензии, циркуляторного шока, септического шока, нейрогенной ортостатической гипотензии, синдрома постуральной ортостатической тахикардии (POTS), сердечной недостаточности, кардиогенного шока, ожирения, почечной недостаточности, хронического заболевания почек, макулярного отека, глаукомы, инсульта, заболевания легких, легочного фиброза, воспаления, астмы, нарушения роста скелета, переломов костей, диабета, гипогликемии и рака.

[063] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам профилактики или лечения NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства, включающим введение терапевтически эффективного количества анти-NPR1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить с профилактической или терапевтической целью субъекту (например, субъекту, имеющему или имеющему риск развития NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент или композицию, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению, вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством или способом лечения. Второй терапевтический агент или способ лечения в некоторых вариантах осуществления могут быть выбраны из группы, состоящей из ингибитора ангиогенеза, вазоконстриктора/вазопрессора, иммунодепрессанта, аскорбиновой кислоты, ингибитора кальциневрина, кортикостероида, ингибитора VEGF, противоотечного средства, антидепрессанта, гормонального контроля рождаемости, стимулятора (включая сердечный стимулятор), кофеина, экстракорпоральной мембранной оксигенации, желудочкового вспомогательного устройства, внутриортального баллонного насоса, изменения образа жизни, пищевой добавки, противомикробного препарата, инсулина и противовоспалительного средства. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент или способ лечения может представлять собой агент или способ лечения, которые помогают противодействовать или снижать любой возможный(ые) побочный эффект(ы), связанный(ые) с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению, если такой(ие) побочный эффект(ы) должно произойти. Антитело или его фрагмент, или композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению, можно вводить подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутривнутрибрюшинно, перорально или внутримышечно. Антитело или его фрагмент можно вводить в дозе примерно от 0,1 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых

вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению можно вводить в одной или более дозах, составляющих от 10 до 600 мг.

[064] Настоящее изобретение также включает применение анти-NPR1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, для которого было бы полезно блокировать связывание и/или активность NPR1.

[065] Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание фигур

[066] На фиг. 1A и 1B показано, что анти-NPR1 антитела ингибировали (фиг. 1A) ANP и (фиг. 1B) BNP, индуцировавшие активацию hNPR1. Клетки предварительно обрабатывали возрастающими концентрациями анти-NPR1 антител, контрольным mAb или только буфером для разведения в течение 15 мин при 37°C, с последующим повышением концентраций ANP, BNP, 0,2 нМ ANP или 0,7 нМ BNP, в течение 30 мин при 37°C. Эксперимент проводили в двух повторах. Незакрашенные символы обозначают условия, когда испытуемый образец не добавляли или добавляли только постоянную концентрацию ANP или BNP, и закрашенные символы обозначают условия, когда испытуемый образец добавляли в диапазоне концентраций; буфер для разведения: OptiMEM с 0,1% FBS.

[067] На фиг. 2A-2E показано неконкурентное ингибирование ANP-опосредованной активации NPR1 под действием (фиг. 2A) H4H22034N, (фиг. 2B) REGN7541, (фиг. 2C) REGN7544 и (фиг. 2D) REGN7548 с клетками HEK293/hNPR1. Данные на фиг. 2A-2D анализировали с использованием анализа графика Шильда (фиг. 2E) для оценки наклона регрессии Шильда для каждого из анти-NPR1 антител. Детектирование интенсивности флуоресценции и концентрации cGMP рассчитывали, как описано в экспериментальной процедуре. Эксперимент проводили в двух повторах. Никакую стимуляцию лигандом для каждой указанной концентрации антитела не наносили на график при 0,1 пМ и не включали в анализ графика Шильда. Незакрашенные символы обозначают условия только с одним ANP без испытуемого образца; закрашенные символы обозначают условия, когда испытуемый образец добавляли в указанных концентрациях 50 нМ, 150 нМ или 450 нМ с ANP в диапазоне концентраций от 1 пМ до 1 мкМ; буфер для разведения: OptiMEM с 0,1% FBS; CR: коэффициент концентрации.

[068] На фиг. 3A-3C показано, что анти-NPR1 антитела индуцировали интернализацию NPR1, что определяли с использованием анализа цитотоксичности с вторичным ADC (фиг. 3A) в отсутствие лиганда или в присутствии (фиг. 3B) 100 нМ ANP или (фиг. 3C) 100 нМ BNP. Клетки HEK293/hNPR1 предварительно обрабатывали возрастающими концентрациями анти-NPR1 антител, контрольным mAb или буфером для разведения в присутствии или в отсутствие 100 нМ ANP или 100 нМ BNP в течение 5 мин при 37°C, с последующей вторичной обработкой ADC в течение 3 суток при температуре 37°C. Эксперимент проводили в двух повторах. Незакрашенные символы обозначают условия, когда испытуемый образец не добавляли или добавляли только постоянную

концентрацию ANP или BNP, и закрашенные символы обозначают условия, когда испытуемый образец добавляли в диапазоне концентраций; буфер для разведения: OptiMEM с 0,1% FBS.

[069] На фиг. 4 показаны немедленные эффекты антагонистических mAb к NPR1 на пульсовое давление у мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением - однократная доза 25 мг/кг. Мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным проводили однократную внутривенную инъекцию 25 мг/кг моноклонального антагонистического mAb к NPR1 или PBS, как показано в таблице 25. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, n=6 на группу.

[070] На фиг. 5 показано влияние антагонистических mAb к NPR1 на систолическое артериальное давление у мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным кровяным давлением - однократная доза 25 мг/кг. Мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным проводили однократную внутривенную инъекцию 25 мг/кг антагонистического mAb к NPR1 или PBS, как показано в таблице 25. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, n=6 на группу.

[071] На фиг. 6 показано влияние антагонистических mAb к NPR1 на систолическое артериальное давление у мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным кровяным давлением - однократная доза 1 мг/кг. Мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным проводили однократную подкожную инъекцию 1 мг/кг антагонистического mAb к NPR1 или однократную инъекцию 25 мг/кг mAb контрольного изотипа IgG4P, как показано в таблице 28. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, n=4-5 на группу.

[072] На фиг. 7 показано влияние антагонистических mAb к NPR1 на систолическое артериальное давление у мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением - однократная доза 25 мг/кг. Мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным проводили однократную подкожную инъекцию 25 мг/кг антагонистического mAb к NPR1 или mAb контрольного изотипа IgG4P, как показано в таблице 28. Все представляют собой средние значения \pm SEM, n=4-5 на группу.

[073] На фиг. 8 показано влияние антагонистических mAb к NPR1 на систолическое артериальное давление у мышей с гипотензией NPR1^{hu/hu}, индуцированной сверхэкспрессией ANP. Мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным вводили одну дозу HDD 50 мкг контрольной или плазмиды ANP с последующей однократной внутривенной инъекцией 25 мг/кг антагонистического mAb к NPR1 или контрольного изотипа, как показано в таблице 31. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, n=4-7 на группу.

[074] На фиг. 9А и 9В показано влияние антагонистических mAb к NPR1 на абсолютную (фиг. 9А) и относительную массу сердца (фиг. 9В) у мышей с гипотензией NPR1^{hu/hu}, индуцированной сверхэкспрессией. Мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным проводили однократную подкожную инъекцию 25 мг/кг антагонистического mAb к NPR1 или mAb контрольного изотипа IgG4P, как показано в таблице 31. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, n=5-8 на группу.

[075] На фиг. 10 показано влияние антагонистических mAb к NPR1 на пульсовое давление у мышей NPR1^{hu/hu} с гипотензией, индуцированной LPS - однократная профилактическая или терапевтическая внутривенная доза 25 мг/кг. Мышей NPR1^{hu/hu}, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным проводили однократную внутрибрюшинную инъекцию 5 мг/кг LPS или физиологического раствора и однократную внутривенную инъекцию антагонистического mAb к NPR1 или PBS примерно за 24 ч до или через 8 ч после введения дозы LPS, как показано в таблице 35. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, n=7-10 на группу.

[076] На фиг. 11 показано среднее изменение пульсового давления, нормализованное к исходному уровню для каждой группы обработки за 3 суток до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента. Данные выражены в виде среднего значения по группе \pm стандартная ошибка среднего.

[077] На фиг. 12 показано среднее изменение систолического артериального давления, нормализованного к исходному уровню, для каждой группы обработки за 3 суток до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента. Данные выражены в виде среднего значения по группе \pm стандартная ошибка среднего. Вертикальные пунктирные линии обозначают введение лекарственного средства указанным путем введения (т. е. п/к или перорально).

Подробное описание изобретения

[078] Прежде чем описывать способы по настоящему изобретению, следует понимать, что данное раскрытие не ограничивается конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая здесь, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[079] Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистами в области техники, к которой относится данное раскрытие. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы в практике или при тестировании настоящего изобретения, сейчас описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, указанные здесь, в полном

объеме включены в настоящий документ посредством ссылки.

Определения

[080] Термин «NPR1», также называемый «NPRA», относится к рецептору натрийуретического пептида 1 (также известному как рецептор натрийуретического пептида А). NPR1 представляет собой гомодимерную трансмембранную гуанилатциклазу, фермент, катализирующий синтез cGMP. NPR1 является рецептором как для предсердных (ANP), так и для мозговых (BNP) натрийуретических пептидов и претерпевает конформационные изменения во внеклеточном домене при связывании лиганда (Ogawa et al., 2004 J. Biol. Chem., 279: 28625-31). Белок имеет 4 различных участка, содержащих внеклеточный лиганд-связывающий домен, одну трансмембранную область, внутриклеточный гомологичный домен, подобный протеинкиназе, и каталитический домен с гуанилилциклазной активностью. Аминокислотная последовательность полноразмерного белка NPR1 представлена аминокислотной последовательностью, имеющейся в UniProtKB/Swiss-Prot под идентификационным номером P16066.1. Термин «NPR1» включает рекомбинантный белок NPR1 или его фрагмент. Данный термин также охватывает белок NPR1 или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или с сигнальной последовательностью, такой как ROR1 (например, SEQ ID NO: 74-78).

[081] Как здесь используется, термин «антитело» предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (т.е. «полными» цепями молекулы антител»), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи («LCVR или «V_L») и константной области легкой цепи (CL). V_H- и V_L-области можно дополнительно подразделить на области гиперварибельности, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В некоторых вариантах осуществления изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

[082] Также возможна замена одного или более остатков CDR или пропуск одного или более CDR. В научной литературе описаны антитела, в которых могут присутствовать один или два CDR для связывания. Padlan et al. (1995, FASEB J., 9:133-139) анализировали области контакта между антителами и их антигенами, основываясь на опубликованных

кристаллических структурах, и пришли к выводу, что только от одной пятой до одной трети остатков CDR фактически контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил множество антител, в которых один или два CDR не имели аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos et al., 2002, J. Mol. Biol., 320:415-428).

[083] Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно идентифицировать на основе результатов предшествующих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются), из областей CDR по Kabat, лежащих за пределами CDR по Chothia, посредством молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или его остаток(и) пропущен, то их обычно заменяют аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности человеческого антитела или консенсусе таких последовательностей. Положения для замены внутри CDR и аминокислот для замены также можно выбрать эмпирически. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными.

[084] Полностью человеческие моноклональные анти-NPR1 антитела, раскрытые в настоящем документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или CDR-участках переменных областей тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко установить сравнением аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или CDR-участках подвергают мутации в соответствующий остаток(и) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток(и) другой последовательности зародышевой линии человека, или в остаток с использованием консервативной аминокислотной замены соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются здесь совместно как «зародышевые мутации»). Специалист в данной области, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, описанных в настоящем документе, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все остатки каркасной области и/или CDR в V_H и/или V_L -областях подвергают обратной мутации на остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергают обратной мутации в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других

вариантах осуществления один или более остатков каркаса и/или CDR подвергают мутации на соответствующий остаток(и) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой было первоначально получено антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасной области и/или CDR-участках, например, где определенные отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются из исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или подвергают мутации в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко тестировать на наличие одного или более желаемых свойств, таких как повышенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические биологические свойства, сниженная иммуногенность и т. д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, включены в настоящее описание.

[085] Настоящее изобретение также включает полностью человеческие моноклональные анти-NPR1 антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, имеющих одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает анти-NPR1 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе.

[086] Как здесь используется, термин «человеческое антитело» или «полностью человеческое антитело» предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие mAb по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодированные последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин «человеческое антитело» или «полностью человеческое антитело», используемый в настоящем документе, не предназначен для включения моноклональных антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были привиты на последовательности FR человека. Данный термин включает антитела, которые рекомбинантно продуцируются у млекопитающего, отличного от человека, или в клетках млекопитающего, отличного от человека. Этот термин не предназначен для включения антител, выделенных или продуцированных в организме человека.

[087] Как здесь используется, термин «рекомбинантный» относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам по настоящему изобретению, созданным, экспрессированным, выделенным или полученным с использованием технологий или способов, известных в данной области техники, таких как технология рекомбинантной ДНК, которые включают, например, ДНК сплайсинг и трансгенную экспрессию. Термин относится к антителам, экспрессированным в организме млекопитающих, отличных от человека (включая трансгенных млекопитающих, отличных от человека, например, трансгенных мышей) или в экспрессионной клеточной системе (например, клетках CHO), или выделенных из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител.

[088] Термин «специфически связывается» или «связывается специфически с» и т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться константой равновесия диссоциации, равной, по меньшей мере, примерно 1×10^{-8} М или ниже (например, более низкое значение K_D означает более прочное связывание). Способы определения того, связываются ли две молекулы специфически, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Как описано в настоящем документе, антитела были идентифицированы методом поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, которые специфически связываются с NPR1. Более того, мультиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в NPR1 и одним или более дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя разными областями NPR1, тем не менее, считаются антителами, которые «специфично связываются», как используется в настоящем документе.

[089] Термин «антитело с высокой аффинностью» относится к таким mAb, которые имеют аффинность связывания с NPR1, выраженную в виде K_D , по меньшей мере, 10^{-8} М; предпочтительно 10^{-9} М; более предпочтительно 10^{-10} М, еще более предпочтительно 10^{-11} М, как определено методом поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™ или ELISA аффинность к раствору.

[090] Термин «скорость замедления», « K_{off} » или « kd » означает антитело, которое диссоциирует от NPR1, с константой скорости $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или ниже, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или ниже, как определено методом поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™.

[091] Термины «антигенсвязывающий участок» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п., используемые в настоящем документе, включают любой встречающийся в природе, полученный ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела» в контексте настоящего документа относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с белком NPR1.

[092] В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагменты антител по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с фрагментом, таким как лиганд или терапевтический фрагмент («иммуноконъюгат»), вторым анти-NPR1 антителом или любым другим терапевтическим фрагментом, пригодным для лечения NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства.

[093] Как здесь используется, термин «выделенное антитело» предназначен для обозначения антитела, которое практически не содержит других антител (Ab), имеющих другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с NPR1 или его фрагмент, практически не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от NPR1).

[094] Как здесь используется, термин «антагонистическое антитело» (или «антитело, которое блокирует или снижает активность NPR1»), предназначен для обозначения антитела, связывание которого с NPR1 приводит к блокированию или ослаблению сигнального пути NPR1 и/или, по меньшей мере, одной биологической активности NPR1. Например, антагонистическое анти-NPR1 антитело может повышать системное артериальное давление при введении субъекту, нуждающемуся в этом. Анти-NPR1 антитела, раскрытые в настоящем документе, представляют собой антитела-антагонисты.

[095] Как здесь используется, «активирующее антитело» или «агонистическое антитело» (или «антитело, которое повышает или потенцирует активность NPR1» или «антитело, которое стабилизирует активированную конформацию»), предназначено для обозначения антитела, связывание которого с NPR1 приводит к активации, по меньшей мере, одной биологической активности NPR1. Например, активирующее анти-NPR1 антитело или агонистическое анти-NPR1 антитело может снижать системное артериальное давление при введении субъекту, нуждающемуся в этом.

[096] Как здесь используется, термин «поверхностный плазмонный резонанс» относится к оптическому явлению, которое позволяет проводить анализ биомолекулярных взаимодействий в режиме реального времени посредством детектирования изменений в концентрациях белка в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

[097] Как здесь используется, термин « K_D » предназначен для обозначения константы равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

[098] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и оказывать разное биологическое действие. Термин «эпитоп» также относится к участку антигена, на который отвечают В- и/или Т-клетки. Термин также относится к области антигена, с которой связывается антитело. Эпитопы можно определить как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно представляют собой

подмножество структурных эпитопов и содержат такие остатки, которые непосредственно способствуют обеспечению аффинности взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, то есть состоять из нелинейных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, в некоторых вариантах осуществления, могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или конкретные характеристики заряда.

[099] Как здесь используется, термин «перекрестно конкурирует» означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с антигеном и ингибируют или блокируют связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Данный термин также включает конкуренцию между двумя антителами в обеих ориентациях, т.е. первое антитело, которое связывается и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В некоторых вариантах осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. Альтернативно, первое и второе антитела могут связываться с разными, но перекрывающимися эпитопами, так что связывание одного из них ингибирует или блокирует связывание второго антитела, например, посредством стерических затруднений. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерить способами, известными в данной области, например, с использованием анализа бислойной интерферометрии без метки в режиме реального времени. Перекрестную конкуренцию между двумя антителами можно выразить как связывание второго антитела, которое меньше фонового сигнала за счет самосвязывания (где первое и второе антитела представляют собой одно и то же антитело). Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена, например, в виде % связывания второго антитела, которое меньше, чем базовое фоновое самосвязывание (где первое и второе антитела представляют собой одно и то же антитело).

[0100] Термин «существенная идентичность» или «по существу идентичные», когда он относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью), имеет место идентичность нуклеотидной последовательности, по меньшей мере, примерно по 90% и более предпочтительно, по меньшей мере, примерно по 95%, 96%, 97%, 98% или 99% азотистым основаниям, измеренная с использованием любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с референтной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в некоторых случаях, кодировать полипептид, имеющий ту же или по существу сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодированный референтной молекулой нуклеиновой кислоты.

[0101] Применительно к полипептидам термин «существенное сходство» или

«существенно сходные» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с использованием программ GAP или BESTFIT с использованием весовых коэффициентов пропуска по умолчанию, имеют, по меньшей мере, 90% идентичность последовательностей, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) со схожими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена существенно не меняет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, то процент или степень сходства можно корректировать в сторону повышения, чтобы внести поправку на консервативный характер замены. Средства для осуществления такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.*, 24: 307-331, которые включены сюда посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными консервативными группами аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в публикации Gonnet, et al. (1992) *Science*, 256: 1443-45, включенной в настоящий документ посредством ссылки. «Умеренно консервативная» замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0102] Сходство последовательностей полипептидов обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет сходные последовательности, используя показатели сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности

также можно сравнивать с помощью FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, каждый из указанных источников включен в настоящий документ посредством ссылки.

[0103] Под выражением «терапевтически эффективное количество» подразумевается количество, которое обеспечивает желаемый эффект, для которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и может быть установлено специалистом в данной области с использованием известных методов (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*). Как здесь используется, выражение относится к количеству, которое блокирует NPR1 (например, передачу сигналов NPR1, активность NPR1) и/или которое повышает системное артериальное давление.

[0104] Как здесь используется, термин «субъект» относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, нуждающемуся в ослаблении, профилактике и/или лечении NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства, такого как гипотензия. Данный термин включает в себя людей, которые страдают или подвержены риску развития такого заболевания или расстройства.

[0105] Как здесь используется, термины «лечить», «лечение» или «проводить лечение» относятся к снижению или ослаблению тяжести, по меньшей мере, одного симптома или признака NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства в результате введения терапевтического агента, такого как антагонистическое антитело по настоящему изобретению, субъекту, нуждающемуся в этом. Данные термины включают ингибирование прогрессирования заболевания или ухудшения симптома/показаний. Эти термины также включают положительный прогноз заболевания, т.е. субъект может быть свободен от заболевания или может иметь снижение заболеваемости после введения терапевтического агента, такого как антитело по настоящему изобретению. Терапевтический агент можно вводить субъекту в терапевтической дозе. Расстройство или заболевание может включать гипотензию и/или расстройство или заболевание, ассоциированное с гипотензией, и/или гипотензию, ассоциированную с заболеванием или расстройством, например, септическим шоком и нейродегенеративным заболеванием. Расстройство или заболевание может также включать синдром постуральной ортостатической тахикардии (POTS).

[0106] Термины «профилактировать», «профилактика» или «проводить профилактику» относятся к ингибированию проявления NPR1-ассоциированного

заболевания или расстройства, такого как гипотензия, или любых симптомов или признаков такого заболевания или расстройства, после введения антитела по настоящему изобретению.

[0107] Как здесь используется, выражение «кровенное давление» может относиться к любому из систолического артериального давления, диастолического артериального давления, среднего артериального давления (площадь под кривой артериального давления/времени, деленная на продолжительность сердечного цикла) и пульсовому давлению (разница между систолическим и диастолическим давлением). Способы измерения артериального давления известны в данной области техники. Артериальное давление измеряется в миллиметрах ртутного столба (мм рт. ст.) и обычно выражается через соотношение систолического (кровенного) давления к диастолическому (кровяному) давлению. Методы измерения включают аускультативный, осциллометрический, ультразвуковой, манжеточный методы. Обычно его можно измерить, например, с помощью цифрового тонометра или сфигмоманометра.

Антигенсвязывающие фрагменты антител

[0108] Если специально не указано иное, то термин «антитело», используемый в настоящем документе, следует понимать как охватывающий молекулы антитела, содержащие две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (т.е. «полные молекулы антитела»), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термины «антигенсвязывающий участок» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п. в контексте настоящего документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела», используемые в настоящем документе, относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с белком NPR1. Фрагмент антитела может включать Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или выделенный CDR. В некоторых вариантах осуществления термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидному фрагменту полиспецифической антигенсвязывающей молекуле. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной геной инженерии, включающие манипуляции и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител) или могут быть синтезированы. ДНК можно секвенировать и манипулировать ею химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления

аминокислот и так далее.

[0109] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как доменно-специфические антитела, однодоменные антитела, доменно-делеционные антитела, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), низкомолекулярные иммуномодулирующие фармацевтические препараты (SMTP) и вариабельные домены IgNAR акул также включены в выражение «антигенсвязывающий фрагмент», при использовании в настоящем описании.

[0110] Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит, по меньшей мере, одну вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и обычно содержит, по меньшей мере, один CDR, который находится рядом или находится в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих V_H-домен, связанный с V_L-доменом, V_H- и V_L-домены могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H- или V_L-домен.

[0111] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать, по меньшей мере, один вариабельный домен, ковалентно связанный, по меньшей мере, с одним константным доменом. Неограничивающие примеры конфигураций вариабельных и константных доменов, которые можно обнаружить в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; и (xiv) V_L-C_L. В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая любую из примерных конфигураций, приведенных выше, вариабельные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять, по меньшей мере, из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними вариабельными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельного и константного домена, приведенных выше, в нековалентной ассоциации

друг с другом и/ или с одним или более мономерными V_H - или V_L -доменами (например, посредством дисульфидной связи(й)).

[0112] Как и в случае полноразмерных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит, по меньшей мере, два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом одного и того же антигена. Любой формат полиспецифического антитела, включая типичные форматы биспецифического антитела, описанные в настоящем документе, может быть адаптирован для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием обычных методов, доступных в данной области техники.

Получение человеческих антител

[0113] Способы получения человеческих антител у трансгенных мышей известны в данной области техники. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, специфически связывающихся с NPR1.

[0114] Иммуноген, включающий любое из следующего, можно использовать для получения антител к белку NPR1. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению получают из организма мышей, иммунизированных полноразмерным нативным белком NPR1 (см., например, идентификационный номер UniProtKB/Swiss-Prot P16066.1) или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. Альтернативно, белок или его фрагмент можно получить с использованием стандартных биохимических методов, модифицировать и использовать в качестве иммуногена.

[0115] В некоторых вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный белок NPR1 или его фрагмент, экспрессированный в *E.coli* или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, SEQ ID NO: 74-78)

[0116] С использованием технологии VELOCIMMUNE® (см., например, патент США № 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к NPR1, имеющие переменную область человека и константную область мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, геном которой включает переменные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что мышь продуцирует антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепи человека. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое

антитело.

[0117] Как правило, мышь VELOCIMMUNE® иммунизируют интересующим антигеном, и лимфатические клетки (такие как В-клетки) выделяют у мышей, которые экспрессируют антитела. Лимфатические клетки могут быть подвергнуты слиянию с клеточной линией миеломы для получения иммортализованных клеточных линий гибридомы, и такие линии гибридомных клеток подвергают скринингу и отбору для идентификации клеточных линий гибридомы, которые продуцируют антитела, специфичные к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделить и связать с желательными изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может быть продуцирован в клетке, такой как клетка СНО. Альтернативно, ДНК, кодирующая антигенспецифические химерные антитела или переменные области легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

[0118] Первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие переменную область человека и константную область мыши. Как представлено в экспериментальном разделе ниже, антитела характеризуют и отбирают по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. д. Константные области мыши заменяют желаемой константной областью человека для создания полностью человеческого антитела по настоящему изобретению, например дикого типа или модифицированные IgG1 или IgG4. Хотя выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики высокой аффинности связывания антигена и целевой специфичности находятся в переменной области.

Биоэквиваленты

[0119] Антагонистические анти-NPR1 антитела и фрагменты антител по настоящему изобретению охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связываться с белком NPR1. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК, кодирующие антитело по настоящему изобретению, охватывают последовательности, которые содержат одно или более добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые по существу биоэквивалентны антителу или фрагменту антитела по настоящему изобретению.

[0120] Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых не демонстрируют существенной

разницы при введении в одной и той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, либо в однократной дозе, либо в многократных дозах. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени абсорбции, но не по скорости абсорбции, и, тем не менее, могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражаются в маркировке, не имеют существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном применении, и считаются с медицинской точки зрения незначительными для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

[0121] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте или эффективности.

[0122] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно один или более раз можно перевести между референтным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого повышения риска проявления побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности по сравнению с продолжением терапии без такого перевода.

[0123] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба функционируют посредством общего механизма или механизмов действия для состояния или условий применения, в той степени, в которой такие механизмы известны.

[0124] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована методами *in vivo* и/или *in vitro*. Методы определения биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, при котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию времени; (b) тест *in vitro*, который коррелирует с данными о биодоступности *in vivo* для человека и обеспечивает достаточную степень прогнозируемости; (c) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором соответствующий немедленный фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется как функция времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое исследование, в котором устанавливается безопасность, эффективность или биодоступность, или биоэквивалентность антитела.

[0125] Биоэквивалентные варианты антител по настоящему изобретению могут быть сконструированы, например, посредством осуществления различных замен остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для проявления биологической активности. Например, остатки цистеина, которые не являются необходимыми для биологической активности, можно удалить или заменить другими аминокислотами, чтобы предотвратить образование ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные

антитела могут включать варианты антител, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Анти-NPR1 антитела, содержащие варианты Fc

[0126] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к анти-NPR1 антителам, содержащим Fc-область, содержащую одну или более мутаций, которые повышают или снижают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает анти-NPR1 антитела, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-области, где мутация(и) повышает аффинность Fc-области к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH варьируется примерно от 5,5 до примерно 6,0). Такие мутации могут привести к увеличению периода полувыведения антитела из сыворотки при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация включает модификацию 265A (например, D265A) и/или модификацию 297A (например, N297A).

[0127] Например, настоящее изобретение включает анти-NPR1 антитела, содержащие Fc-область, содержащую одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L and N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A and N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеуказанных мутаций Fc-области и других мутаций в переменных доменах антитела, раскрытого в настоящем документе, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

[0128] Настоящее изобретение также относится к анти-NPR1 антителам, содержащим химерную константную область тяжелой цепи (C_H), где химерная область C_H содержит сегменты, полученные из областей C_H более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела по настоящему изобретению могут содержать химерную область C_H, содержащую участок или весь домен C_H2, полученный из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в сочетании с участком или всем доменом

C_{H3} , полученным из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению содержат химерную область C_H , имеющую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность «верхнего шарнира» (аминокислотные остатки из положений от 216 до 227 согласно системе нумерации ЕС), полученную из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с последовательность «нижнего шарнира» (аминокислотные остатки из положений от 228 до 236 согласно системе нумерации ЕС), полученную из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира IgG1 человека или верхнего шарнира IgG4 человека, и аминокислотные остатки, полученные из нижнего шарнира IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную область C_H , как описано в настоящем документе, может, в некоторых вариантах осуществления, проявлять модифицированные эффекторные функции F_c без отрицательного влияния на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, публикацию заявки на патент США 2014/0243504, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Биологические характеристики антител

[0129] В общем, антагонистические антитела по настоящему изобретению функционируют посредством связывания с белком NPR1 и блокирования его сигнального пути и/или активности. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с NPR1 человека при 25°C и при 37°C с константой диссоциации (K_D) ниже 1,7 нМ, как определено анализом поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 3 настоящего документа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 человека с K_D ниже примерно 1,27 нМ, ниже примерно 0,34 нМ, ниже примерно 0,08 нМ, ниже примерно 0,06 нМ, как определено анализом поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0130] Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с NPR1 обезьяны при 25°C и при 37°C с константой диссоциации (K_D) ниже 1,99 нМ, как определено анализом поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 3 настоящего документа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 обезьяны с K_D ниже примерно 1,23 нМ, ниже примерно 0,32 нМ, ниже примерно 0,1 нМ, ниже примерно 0,07 нМ, как определено анализом поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 3 настоящего документа, или по существу

аналогичного анализа.

[0131] Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые связываются с NPR1 человека в присутствии ANP при 25°C и при 37°C с K_D ниже 1,52 нМ, как определено анализом поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 3 настоящего документа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 человека в присутствии ANP при 25°C и при 37°C с K_D ниже примерно 1,1 нМ, ниже примерно 0,8 нМ, ниже примерно 0,6 нМ и ниже примерно 0,5 нМ, как определено анализом поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0132] Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые ингибируют индуцированную лигандом активацию NPR1 (например, индуцированную ANP или BNP), как определено анализом накопления cGMP, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 6 данного документа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты ингибируют индуцированную лигандом активацию NPR1, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 92%, по меньшей мере, примерно на 99% и, по меньшей мере, примерно на 100%, как определено с использованием анализа накопления cGMP, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 6 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0133] Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые связываются с NPR1 человека в присутствии или в отсутствие ANP или BNP с EC_{50} ниже 2,9 нМ, как определено иммуноанализом на основе электрохемилюминесценции, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 7 настоящего документа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 человека в присутствии или в отсутствие ANP или BNP с EC_{50} ниже примерно 2,1 нМ, ниже примерно 1,2 нМ и ниже примерно 0,6 нМ, как определено иммуноанализом на основе электрохемилюминесценции, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 7 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0134] Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые связываются с NPR1 обезьяны в присутствии или в отсутствие ANP или BNP с EC_{50} ниже 4,2 нМ, как определено иммуноанализом на основе электрохемилюминесценции, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 7 настоящего документа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с NPR1 обезьяны в присутствии или в отсутствие ANP или BNP с EC_{50} ниже примерно 2,9 нМ, ниже примерно 2,1 нМ и ниже примерно 0,7 нМ, как определено иммуноанализом на основе электрохемилюминесценции, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 7 настоящего документа.

документа, или по существу аналогичного анализа.

[0135] Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые повышают системное артериальное давление (включая систолическое, диастолическое, среднее артериальное и пульсовое давление) при введении мышам с нормальным давлением и гипотензией, где повышение системного артериального давления сохраняется примерно до 28 суток после введения разовой дозы, например, как описано в примере 9 настоящего документа.

[0136] Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые повышают системное артериальное давление при введении мышам с гипотензией, индуцированной сверхэкспрессией ANP, где повышение системного артериального давления сохраняется примерно до 28 суток после введения однократной дозы, например, как описано в примере 10 настоящего документа.

[0137] Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые повышают системное артериальное давление у мышей с гипотензией, индуцированной LPS, как описано в примере 11 настоящего документа.

[0138] В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с белком NPR1 в присутствии или в отсутствии ANP или BNP, и снижает или блокирует сигнальный путь и/или активность NPR1, где антитело или его фрагмент проявляет одну или более из следующих характеристик: (a) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело; (b) связывается с NPR1 человека при 25°C и при 37°C с константой диссоциации (K_D) ниже 1,7 нМ, как определено анализом поверхностного плазмонного резонанса; (c) связывается с NPR1 обезьяны при 25°C и 37°C с K_D ниже 1,99 нМ, как определено анализом поверхностного плазмонного резонанса; (d) связывается с NPR1 человека в присутствии ANP при 25°C и при 37°C с K_D ниже 1,52 нМ, как определено анализом поверхностного плазмонного резонанса; (e) ингибирует индуцированную лигандом активацию NPR1, как определено с использованием анализа накопления cGMP; (f) связывается с NPR1 человека в присутствии или в отсутствии ANP или BNP с EC_{50} ниже 2,9 нМ, как определено иммуноанализом на основе электрохемилюминесценции; (g) связывается с NPR1 обезьяны в присутствии или в отсутствии ANP или BNP с EC_{50} ниже 4,2 нМ, как определено иммуноанализом на основе электрохемилюминесценции; (h) повышает системное артериальное давление при введении мышам с нормальным давлением и гипотензией, где повышение системного артериального давления сохраняется примерно до 28 суток после введения однократной дозы; (i) повышает системное артериальное давление при введении мышам с гипотензией, индуцированной сверхэкспрессией ANP, где повышение системного артериального давления сохраняется примерно до 28 суток после введения однократной дозы; (j) повышает системное артериальное давление у мышей с гипотензией, индуцированной LPS; и (k) содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из

группы, состоящей из последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1.

[0139] Антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или несколькими из вышеуказанных биологических характеристик или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны для специалистов в данной области техники из обзора настоящего описания, включая рабочие примеры, представленные в настоящем документе.

Картирование эпитопов и связанные технологии

[0140] Настоящее изобретение относится к антагонистическим анти-NPR1 антителам, которые взаимодействуют с одной или более аминокислотами, обнаруженными в одной или более областях молекулы белка NPR1. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных внутри любого из вышеуказанных доменов молекулы белка NPR1 (например, линейный эпитоп в домене). Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных внутри одного или обоих вышеуказанных доменов белковой молекулы (например, конформационный эпитоп).

[0141] Различные методы, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для определения того, «насколько антитело взаимодействует с одной или более аминокислотами» внутри полипептида или белка. Типичные методы включают, например, рутинные анализы перекрестного блокирования, такие как описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие методы включают аланин-сканирующий мутационный анализ, анализ с использованием пептидного блота (Reineke, (2004) *Methods Mol. Biol.*, 248: 443-63), анализ расщепления пептида, кристаллографические методы исследования и ЯМР-анализ. Кроме того, могут быть использованы такие методы, как вырезание эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.*, 9:487-496). Другим методом, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является обмен водорода/дейтерия, детектируемый с использованием масс-спектрометрии. В общих чертах, метод обмена водорода/дейтерия включает мечение дейтерием интересующего белка с последующим связыванием антитела с белком, меченным дейтерием. Затем комплекс белок/антитело переносится в воду, и обменные протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом антител, подвергаются обратному обмену дейтерий на водород с более медленной скоростью, чем обменные протоны в аминокислотах, которые не являются частью интерфейса. В результате аминокислоты, которые образуют часть интерфейса белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, следовательно, иметь относительно большую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в интерфейс. После диссоциации антитела целевой

белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, соответствующие конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry*, 267: 252-259; Engen and Smith, (2001) *Anal. Chem.*, 73: 256A-265A.

[0142] Термин «эпитоп» относится к участку антигена, на который отвечают В-и/или Т-клетки. Эпитопы В-клеток могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, расположенных рядом в результате третичной укладки белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой, обычно «теряются» при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает, по меньшей мере, 3, и чаще, по меньшей мере, 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

[0143] Профилирование с помощью модификации (MAP), также известное как профилирование антител на основе структуры антигена (ASAP), представляет собой метод, который классифицирует большое количество моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, в соответствии со сходством профиля связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными антигенными поверхностями (см. патент США 2004/0101920, полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, явно отличающийся от эпитопа, представленного другой категорией, или частично перекрывающийся с ним. Данная технология позволяет быстро фильтровать генетически идентичные антитела, так что характеристика может быть сосредоточена на генетически различных антителах. При применении для скрининга гибридом MAP может облегчить идентификацию редких клонов гибридом, которые продуцируют моноклональные антитела, имеющие желаемые характеристики. MAP можно использовать для сортировки антител по настоящему изобретению на группы антител, связывающихся с разными эпитопами.

[0144] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает антагонистические анти-NPR1 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с одним или более эпитопами, обнаруженными во внеклеточном домене NPR1. Эпитоп(ы) может состоять из одной или более смежных последовательностей из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных во внеклеточном домене NPR1. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных внутри NPR1.

[0145] Настоящее изобретение относится к антагонистическим анти-NPR1 антителам, которые связываются с тем же эпитопом или участком эпитопа, что и любое из специфических типичных антител, приведенных в таблице 1. Аналогично, настоящее изобретение также относится к антагонистическим анти-NPR1 антителам, которые конкурируют за связывание с белком NPR1 или его фрагментом с любым из конкретных

типичных антител, приведенных в таблице 1. Например, настоящее описание включает антагонистические анти-NPR1 антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с белком NPR1 с одним или более антителами, приведенными в списке в таблице 1.

[0146] Можно легко определить, насколько антитело связывается с тем же эпитопом, что и референтное анти-NPR1 антитело, или конкурирует за связывание с ним, используя обычные методы, известные в данной области. Например, для определения того, насколько тестируемое антитело связывается с тем же эпитопом, что и референтное анти-NPR1 антитело по настоящему изобретению, референтному антителу позволяют связываться с белком или пептидом NPR1 в условиях насыщения. Далее оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой белка NPR1. Если тестируемое антитело способно связываться с NPR1 после насыщенного связывания с референтным анти-NPR1 антителом, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, чем референтное анти-NPR1 антитело. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с белком NPR1 после насыщенного связывания с референтным анти-NPR1 антителом, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный референтным анти-NPR1 антителом.

[0147] Для определения того, насколько антитело конкурирует за связывание с референтным анти-NPR1 антителом, описанную выше методологию связывания выполняют в двух ориентациях: в первой ориентации референтному антителу позволяют связываться с белком NPR1 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой NPR1. Во второй ориентации тестируемому антителу позволяют связываться с молекулой NPR1 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания референтного антитела с молекулой NPR1. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой NPR1, то делается вывод, что тестируемое антитело и референтное антитело конкурируют за связывание с NPR1. Как будет понятно специалистам в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с референтным антителом, не обязательно связывается с тем же эпитопом, что и референтное антитело, но может стерически блокировать связывание референтного антитела посредством связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

[0148] Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого, по меньшей мере, на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже на 99%, как определено анализом конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.*, 1990 50:1495-1502). Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или элиминируют связывание одного антитела, уменьшают или элиминируют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или элиминируют связывание одного антитела, уменьшают или элиминируют связывание другого.

[0149] Затем можно провести дополнительные рутинные эксперименты (например, пептидные мутации и анализ связывания) для подтверждения того, насколько наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела действительно связано со связыванием с тем же эпитопом, что и референтное антитело, или стерическое блокирование (или другое явление) является ответственным за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода можно проводить с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области.

[0150] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который специфически связывается с белком рецептора натрийуретического пептида 1 (NPR1) и блокирует NPR1.

Иммуноконъюгаты

[0151] Настоящее изобретение относится к человеческому антагонистическому моноклональному анти-NPR1 антителу, конъюгированному с терапевтической группой («иммуноконъюгат»), для лечения NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства (например, гипотензии). В настоящем документе термин «иммуноконъюгат» относится к антителу, которое химически или биологически связано с радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, целевой или репортерной группой, ферментом, пептидом или белком или терапевтическим агентом. Антитело может быть связано с радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, целевой или репортерной группировкой, ферментом, пептидом или терапевтическим агентом в любом месте молекулы, при условии, что оно способно связывать свою мишень. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитело-лекарственное средство и слитые белки антитело-токсин. В одном варианте осуществления агент может представлять собой второе отличное антитело к белку NPR1. При определении типа терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с анти-NPR1 антителом, следует учитывать патологическое состояние, подлежащее лечению, и желаемый терапевтический эффект, который необходимо достичь. Примеры подходящих агентов для образования иммуноконъюгатов известны в данной области; см., например, WO 05/103081.

Полиспецифические антитела

[0152] Антагонистические антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут быть специфичными к различным эпитопам одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные к более чем одному полипептиду-мишени. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol., 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol., 22:238-244.

[0153] Любую из полиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению или ее варианты можно сконструировать с использованием стандартных молекулярно-биологических методов (например, технологии рекомбинантной ДНК и экспрессии белков), как известно специалистам в данной области.

[0154] В некоторых вариантах осуществления NPR1-специфические антитела получают в биспецифичном формате («биспецифическом»), в котором переменные области, связывающиеся с различными доменами белка NPR1, связаны вместе для придания двухдоменной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Переменные области, специфичные для отдельных доменов (например, сегменты N-концевого домена) или которые могут связываться с разными областями внутри одного домена, соединяются в пары на структурном каркасе, который позволяет каждой области одновременно связываться с отдельными эпитопами, или в разные области внутри одного домена. В одном примере биспецифичности переменные области тяжелой цепи (V_H) из связывающего вещества со специфичностью в отношении одного домена рекомбинируют с переменными областями легкой цепи (V_L) из серии связывающих веществ со специфичностью в отношении второго домена для идентификации неродственных партнеров V_L , которые могут быть соединены с исходной V_H без нарушения исходной специфичности этой V_H . Таким образом, один сегмент V_L (например, V_{L1}) может быть объединен с двумя разными доменами V_H (например, V_{H1} и V_{H2}) для создания биспецифического домена, состоящего из двух связывающих «плечей» (V_{H1} - V_{L1} и V_{H2} - V_{L1}). Использование одного сегмента V_L снижает сложность системы и тем самым упрощает и повышает эффективность процессов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для создания биспецифических антител (см., например, US2011/0195454 и US2010/0331527).

[0155] Альтернативно, антитела, которые связывают более одного домена и вторую мишень, такие как, помимо прочего, например, второе другое анти-NPR1 антитело, могут быть получены в биспецифическом формате с использованием способов, описанных в настоящем документе, или других методов, известных специалистам в данной области. Переменные области антитела, связывающиеся с различными областями, могут быть связаны вместе с переменными областями, которые связываются с соответствующими сайтами, например, на внеклеточном домене NPR1, чтобы придать двойную антигенную специфичность в пределах одной связывающей молекулы. Соответствующим образом разработанные биспецифические особенности такого рода выполняют двойную функцию. Переменные области со специфичностью к внеклеточному домену объединяются с переменной областью со специфичностью к внеклеточному домену и соединяются в пары на структурном каркасе, который позволяет каждой переменной области связываться с отдельными антигенами.

[0156] Другие типичные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, помимо прочего, например, основанные на scFv биспецифические форматы диател, слияния IgG-scFv, двойной переменной домен (DVD)-Ig, квадрому, выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, общая легкая цепь с выступами-во-впадинах и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, лейциновую застежку, Duobody, IgG1/IgG2, Fab двойного действия (DAF)-IgG и биспецифические форматы Mab² (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-1 и приведенные там ссылки,

для обзора вышеприведенных форматов). Биспецифические антитела также можно сконструировать с использованием конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, где неприродные аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью используются для создания сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотиды, которые затем самособираются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтическое применение и составы

[0157] Настоящее изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим антагонистические анти-NPR1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Терапевтические композиции в соответствии с изобретением будут вводиться с подходящими носителями, эксципиентами и другими агентами, которые включены в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем химикам, работающим в области фармации: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, везикулы, содержащие липиды (катионные или анионные) (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии типа карбовакс (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al., «Compendium of excipients for parenteral formulations» PDA (1998) J. Pharm. Sci. Technol., 52:238-311.

[0158] Доза антитела может варьироваться в зависимости от возраста и размера субъекта, которому его вводят, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. Когда антитело по настоящему изобретению используется для лечения заболевания или расстройства у взрослого пациента или для профилактики такого заболевания, то предпочтительно вводить антитело по настоящему изобретению обычно в однократной дозе примерно от 0,1 до примерно 100 мг/кг массы тела. В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению вводят в разовой дозе примерно 25 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частота и продолжительность лечения могут корректироваться. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно вводить в виде начальной дозы, составляющей, по меньшей мере, примерно от 0,1 мг до примерно 800 мг, примерно от 1 до примерно 600 мг, примерно от 5 до примерно 500 мг, примерно от 10 до примерно 400 мг или примерно 100 мг. В некоторых вариантах осуществления за начальной дозой может следовать введение второй или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть примерно таким же или меньшим, чем для начальной дозы, где последующие дозы разделяются интервалом, по меньшей мере, от 1 до 3 суток; по меньшей мере, одна неделя, по меньшей мере, 2 недели; по меньшей мере, 3 недели; по меньшей мере, 4 недели; по меньшей мере, 5 недель; по

меньшей мере, 6 недель; по меньшей мере, 7 недель; по меньшей мере, 8 недель; по меньшей мере, 9 недель; по меньшей мере, 10 недель; по меньшей мере, 12 недель; или, по меньшей мере, 14 недель.

[0159] Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu, и др., (1987) *J. Biol.*, 262:4429-4432). Способы введения включают, помимо прочего, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, прямой кишки и кишечника и т.д.), и ее можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическую композицию можно также доставлять в везикуле, в частности, в липосоме (см., например, Langer (1990) *Science*, 249:1527-1533).

[0160] Здесь также рассматривается использование наночастиц для доставки антител по настоящему изобретению. Наночастицы, конъюгированные с антителами, могут использоваться как для терапевтических, так и для диагностических целей. Наночастицы, конъюгированные с антителами, а также способы получения и использования подробно описаны Arruebo M. et al., 2009 («Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications» in *J. Nanomat.*, Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включенный в настоящий документ посредством ссылки. Наночастицы могут быть разработаны и конъюгированы с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, и доставлены к клеткам-мишеням. Наночастицы для доставки лекарственных средств также описаны, например, в патентах США № 8257740 или US 8246995, каждый из которых включен в настоящий документ во всей своей полноте посредством.

[0161] В некоторых ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления может быть использован насос. В другом варианте можно использовать полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена вблизи мишени композиции, что требует лишь части системной дозы.

[0162] Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутривенных, внутримышечных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть приготовлены общеизвестными способами.

[0163] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того,

что касается подкожной доставки, то устройство для доставки в виде шприца-ручки легко находит применение при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такое устройство доставки в виде шприца-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки в виде шприца-ручки обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция в картридже введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство доставки в виде шприца-ручки затем может быть повторно использовано. В одноразовом устройстве доставки в виде шприца-ручки нет сменного картриджа. Скорее, одноразовое устройство для доставки шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опорожняется от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

[0164] Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде лекарственных форм в разовой дозе, подходящей для обеспечения дозы активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в разовой дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антитела обычно составляет примерно от 5 до примерно 500 мг на лекарственную форму в разовой дозе; в частности, в форме инъекции, предпочтительно, чтобы антитело содержалось в количестве примерно от 5 до примерно 300 мг и примерно от 10 до примерно 300 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические применения антител

[0165] Антагонистические антитела по настоящему изобретению пригодны для лечения и/или профилактики NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства или состояния, и/или для облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с таким заболеванием, расстройством или состоянием. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно вводить в терапевтической дозе пациенту с NPR1-ассоциированным заболеванием, расстройством или состоянием.

[0166] Расстройство или заболевание может включать гипотензию, и/или расстройство или заболевание, ассоциированное с гипотензией, и/или гипотензию, ассоциированную с заболеванием или расстройством, например, циркуляторный шок, септический шок и нейродегенеративное заболевание. Гипотензия представляет собой снижение системного артериального давления ниже общепринятых низких значений. Гипотензия существует в виде диапазона, без общепринятого стандартного гипотензивного значения, но артериальное давление ниже 90 мм рт. ст. (систолическое)/60 мм рт. ст. (диастолическое) считается гипотензивным. Симптомы гипотензии могут включать, помимо прочего, дурноту, головокружение, обморок, боль в груди, одышку, нерегулярное сердцебиение, повышенную температуру тела, головную боль, ригидность затылочных

мышц, сильную боль в верхней части спины, кашель с мокротой, диарею, рвоту, дизурию, немедленные аллергические реакции, утомляемость и нарушения зрения. Осложнения нелеченной гипотензии с плохим сердечным выбросом являются серьезными и в конечном итоге могут привести к смерти. При надвигающемся шоке или молниеносном шоке нелеченная гипотензия может привести к полиорганной недостаточности (Sharma et al., updated 2021, Hypotension, available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499961/>). В одном варианте осуществления антагонистическое анти-NPR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению применяют для лечения симптома или признака типа гипотензии. В другом варианте осуществления антагонистическое анти-NPR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению применяют для повышения кровяного давления у субъекта, страдающего гипотензией и/или имеющего заболевание или расстройство, ассоциированное с гипотензией.

[0167] Септический шок характеризуется рефрактерной гипотензией, вызывающей неадекватную перфузию тканей, и связан с высокими показателями смертности. Стандартом лечения сепсиса в сочетании с гипотензией является введение вазопрессоров, таких как катехоламины или миметики, вазопрессин или Ang II, для поддержания артериального давления и уровня лактата в сыворотке крови при отсутствии гиповолемии. Однако стандарты лечения вазопрессорами имеют существенные недостатки, в том числе требуют частого титрования, имеют узкий терапевтический диапазон, требуют центрального венозного доступа и ухода в отделениях интенсивной терапии и, возможно, даже снижают капиллярную перфузию (вызывая ишемию тканей (например, пальцевый некроз) при длительном поддержании высокого уровня доз). Таким образом, остается значительная неудовлетворенная потребность в лечении (рефрактерной) гипотензии. В одном варианте осуществления антагонистическое анти-NPR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению применяют для лечения симптома или признака септического шока или для лечения рефрактерной гипотензии при септическом шоке. В другом варианте осуществления применение антагонистического анти-NPR1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению для лечения септического шока или для лечения рефрактерной гипотензии, вызванной септическим шоком, позволяет сократить использование вазопрессоров. В результате требуется сокращение продолжительности пребывания в отделении интенсивной терапии (ICU).

[0168] Нейрогенная ортостатическая гипотензия представляет собой гипотензию в вертикальном положении (кровяное давление падает в положении стоя, что приводит к церебральной гипоперфузии) и обычно возникает за счет дефектов вегетативных рефлексов, связанных с нейродегенеративным заболеванием. Оно осложняет многие заболевания и связано со высоким уровнем заболеваемости, при этом влияние симптомов на повседневную деятельность оценивается как тяжелое или очень тяжелое почти у 50% пациентов. Два одобренных в настоящее время медикаментозных метода лечения имеют лишь среднюю эффективность, оба имеют короткое действие и требуют приема три раза в день (TID). В одном варианте осуществления антагонистическое анти-NPR1 антитело или

его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению применяют для лечения нейрогенной ортостатической гипотензии.

[0169] Расстройство или заболевание может также включать синдром постуральной ортостатической тахикардии (POTS). Данный синдром характеризуется тахикардией плюс симптомами в вертикальном положении, но без гипотензии. При POTS у взрослых регистрируется увеличение частоты сердечных сокращений при смене горизонтального положения к положению стоя (или при тестировании на наклонном столе) не менее чем на 30 ударов в минуту, измеренное в течение первых 10 мин стояния. POTS обычно поражает молодых женщин и вызывает высокий уровень заболеваемости. Симптомы, возникающие при вставании, включают дурноту, тремор, сердцебиение, слабость, утомляемость, нечеткость зрения, периодические обмороки и тому подобное. О значительном снижении качества жизни сообщают более 80% пациентов с POTS. Хотя флудрокортизон, мидодрин и бета-блокаторы широко используются, они не продемонстрировали значительной эффективности лечения; действительно, в настоящее время FDA не одобрено ни одного конкретного препарата для лечения POTS. В одном варианте осуществления антагонистическое анти-NPR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению используют для лечения POTS.

[0170] В некоторых вариантах осуществления антагонистические антитела по настоящему изобретению пригодны для лечения или профилактики, по меньшей мере, одного симптома или признака заболевания или расстройства, выбранного из группы, состоящей из гипотензии, циркуляторного шока, септического шока, нейрогенной ортостатической гипотензии, синдрома постуральной ортостатической тахикардии (POST), сердечной недостаточности, кардиогенного шока, ожирения, почечной недостаточности, хронической болезни почек, макулярного отека, глаукомы, инсульта, заболевания легких, легочного фиброза, воспаления, астмы, нарушения роста скелета, переломов костей, диабета, гипогликемии и рака.

[0171] В настоящем документе также предусматривается применение одного или более антител по настоящему изобретению с профилактической целью у субъектов, подверженных риску развития NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства.

[0172] В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению используются для приготовления фармацевтической композиции или лекарственного средства для лечения пациентов, страдающих заболеванием, расстройством или состоянием, раскрытым в настоящем документе. В другом варианте осуществления антитела по настоящему изобретению используются в качестве дополнительной терапии с любым другим агентом или любой другой терапией, известной специалистам в данной области, полезной для лечения или облегчения заболевания, расстройства или состояния, раскрытого в настоящем документе.

Комбинированная терапия

[0173] Комбинированная терапия может включать антагонистическое антитело по настоящему изобретению и любой дополнительный терапевтический агент, который можно

выгодно комбинировать с антителом по настоящему изобретению или с биологически активным фрагментом антитела по настоящему изобретению. Антитела по настоящему изобретению можно синергически комбинировать с одним или более лекарственными средствами или терапией, используемыми для лечения NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства, включая гипотензию. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению можно комбинировать со вторым терапевтическим средством или терапией для облегчения одного или более симптомов указанного заболевания или состояния.

[0174] В зависимости от заболевания, расстройства или состояния антитела по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, включая, помимо прочего, ингибитор ангиогенеза, вазоконстриктор/вазопрессор, иммунодепрессант, аскорбиновую кислоту, ингибитор кальциневрина, кортикостероид, ингибитор VEGF, противоотечное средство, антидепрессант, гормональный контроль рождаемости, стимулятор (включая сердечный стимулятор), кофеин, экстракорпоральную мембранную оксигенацию, желудочковое вспомогательное устройство, внутриаортальный баллонный насос, изменение образа жизни, пищевую добавку, противомикробный препарат, инсулин и противовоспалительный препарат.

[0175] Как здесь используется, термин «в комбинации с» означает, что дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить до, одновременно или после введения антагонистического анти-NPR1 антитела по настоящему изобретению. Термин «в комбинации» также включает последовательное или одновременное введение анти-NPR1 антитела и второго терапевтического агента или терапии.

[0176] Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту до введения анти-NPR1 антитела по настоящему изобретению. Например, первый компонент можно считать введенным «до» второго компонента, если первый компонент вводится за 1 неделю, за 72 ч, за 60 ч, за 48 ч, за 36 ч, за 24 ч, 12 ч, за 6 ч, за 5 ч, за 4 ч, за 3 ч, за 2 ч, за 1 ч, за 30 мин или менее чем за 30 мин до введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту после введения анти-NPR1 антитела по настоящему изобретению. Например, можно считать, что первый компонент вводится «после» второго компонента, если первый компонент вводится через 30 мин, через 1 ч, через 2 ч, через 3 ч, через 4 ч, через 5 ч, через 6 ч, через 12 ч, через 24 ч, через 36 ч, через 48 ч, через 60 ч, через 72 ч или более после введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно с введением анти-NPR1 антитела по настоящему изобретению. «Одновременное» введение для целей настоящего изобретения включает, например, введение анти-NPR1 антитела и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в одной лекарственной форме или в отдельных лекарственных формах, которые вводят субъекту в течение примерно 30 мин или меньше друг от друга. При введении в

отдельных лекарственных формах каждую лекарственную форму можно вводить одним и тем же путем (например, как анти-NPR1 антитело, так и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно и т.д.); альтернативно, каждую лекарственную форму можно вводить различным путем (например, анти-NPR1 антитело можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить перорально). В любом случае, введение компонентов в однократной дозе, в отдельных лекарственных формах одним и тем же путем или в отдельных лекарственных формах разными путями считается «одновременным введением» для целей настоящего описания. Для целей настоящего изобретения введение анти-NPR1 антитела «до», «одновременно» или «после» (как эти термины определены здесь выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считается введением анти-NPR1 антитела «до», «одновременно» или «после» (как эти термины определены здесь выше) введения анти-NPR1 антитела «в комбинации» с дополнительным терапевтически активным компонентом.

[0177] Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, в которых анти-NPR1 антитело по настоящему изобретению формулировано вместе с одним или более дополнительным терапевтически активным компонентом(ами), как описано в других местах настоящего документа.

Диагностическое применение антител

[0178] Антагонистические антитела по настоящему изобретению можно использовать для детектирования и/или измерения NPR1 в образце, например, в диагностических целях. Некоторые варианты осуществления предусматривают использование одного или более антител по настоящему изобретению в анализах для обнаружения NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства. Типичные диагностические анализы на NPR1 могут включать, например, приведение образца, полученного от пациента, в контакт с анти-NPR1 антителом по настоящему изобретению, где анти-NPR1 антитело помечено детектируемой меткой или репортерной молекулой или используется в качестве захватывающего лиганда для селективного выделения NPR1 из образцов пациентов. Альтернативно, немеченое анти-NPR1 антитело можно использовать в диагностических целях в сочетании со вторичным антителом, которое само мечено детектируемой меткой, или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные типовые анализы, которые можно использовать для детектирования или измерения NPR1 в образце, включают иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA) и активируемую флуоресценцией сортировку клеток (FACS).

[0179] Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах NPR1 по настоящему изобретению, включают любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит обнаружимые количества белка NPR1 или его фрагментов в

нормальных или патологических условиях. Как правило, уровни белка NPR1 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего NPR1-ассоциированным заболеванием), будут измеряться для первоначального установления базового или стандартного уровня NPR1. Данный исходный уровень NPR1 затем можно сравнить с уровнями NPR1, измеренными в образцах, полученных от субъектов с подозрением на NPR1-ассоциированное состояние или симптомы, связанные с таким состоянием.

[0180] Антитела, специфичные к белку NPR1, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном варианте осуществления меткой или фрагментом является биотин. В анализе связывания расположение метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет находиться дистальнее поверхности.

Примеры

[0181] Следующие примеры приведены для того, чтобы представить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как создать и использовать способы и композиции по настоящему изобретению, и они не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают их раскрытием. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых цифровых значений (например, количеств, температур и т. д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, то части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура выражена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет примерно 25°C, и давление представляет собой атмосферное давление или близкое к нему.

Пример 1: получение человеческих антител к рецептору натрийуретического пептида 1 (NPR1)

[0182] Человеческие антитела к белку NPR1 были получены с использованием мышей VELOCIMMUNE[®], содержащих ДНК, кодирующую вариabельные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека. Мышей иммунизировали человеческим NPR1 и ДНК мышинового ANP путем гидродинамической доставки ДНК и повторно иммунизировали с целью усиления иммунного ответа внеклеточным доменом человеческого белка NPR1, в комплексе с мышинным ANP.

[0183] Гуморальный иммунный ответ антител контролировали с использованием NPR1-специфического иммуноанализа. Когда желаемый иммунный ответ достигался, собирали спленоциты и сливали с клетками мышинной миеломы для сохранения их жизнеспособности и формирования клеточных линий гибридомы. Клеточные линии гибридомы подвергали скринингу и отбору для идентификации клеточных линий, продуцирующих NPR1-специфические антитела. Клеточные линии использовали для

получения нескольких химерных анти-NPR1 антител (т.е. антител, обладающих переменными областями человека и константными областями мыши).

[0184] Анти-NPR1 антитела также выделяли непосредственно из антигенположительных мышинных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 7582298, который в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки. С использованием этого способа было получено несколько полностью человеческих анти-NPR1 антител (т.е. антител, обладающих человеческими переменными областями и человеческими константными областями).

[0185] Типичные антитела, полученные, как описано выше, были обозначены как mAb38067, mAb38072, mAb38090 и mAb22034.

[0186] Биологические свойства типичных антител, полученных в соответствии со способами данного примера, подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

Пример 2: аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи

[0187] В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранных анти-NPR1 антител по настоящему изобретению.

Таблица 1

Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb38067	2	4	6	8	10	12	AAS	16
mAb38072	22	24	26	28	30	12	AAS	32
mAb38090	38	40	42	44	46	48	AAS	16
mAb22034	55	57	59	61	63	65	GAS	69

[0188] Соответствующие идентификаторы нуклеиновокислотных последовательностей представлены в таблице 2.

Таблица 2

Идентификаторы нуклеиновокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HC VR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR2	LCDR 3
mAb38067	1	3	5	7	9	11	gctgcatc c	15
mAb38072	21	23	25	27	29	11	gctgcatc c	31
mAb38090	37	39	41	43	45	47	gctgcatc c	49
mAb22034	54	56	58	60	62	64	ggcgcac c	68

[0189] Антитела, указанные в настоящем документе, обычно содержат полностью человеческие переменные области, но могут содержать константные области человека или мыши. Как будет понятно специалистам в данной области, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть преобразовано в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с IgG1 Fc мыши может быть преобразовано в антитело с человеческим IgG1 или человеческим IgG4 и т. д.), но в любом случае переменные области (включая CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, приведенными в таблице 1, останутся теми же, и ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или по существу сходными независимо от происхождения Fc-области.

[0190] В некоторых вариантах осуществления выбранные антитела с Fc IgG1 мыши превращают в антитела с Fc IgG4 человека. В одном варианте осуществления Fc IgG4 содержит 2 или более аминокислотных замен, как описано в US 20100331527. В одном варианте осуществления IgG4 Fc человека содержит мутацию с заменой серина на пролин в шарнирной области (S108P) для обеспечения стабилизации димера. Если не указано иное, то все антитела, использованные в следующих примерах, содержат изотип IgG4 человека.

[0191] Типичные антитела mAb38067, mAb38072, mAb38090 и mAb22034, содержащие IgG4 Fc человека, содержащую мутацию с заменой серина на пролин в шарнирной области (S108P), были обозначены как REGN7541, REGN7544, REGN7548 и H4H22034 соответственно. В таблице 3 приведены идентификаторы нуклеиновокислотных и аминокислотных последовательностей полноразмерных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи этих антител.

Таблица 3

Идентификаторы полноразмерных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи

ID	Название	SEQ ID NO:
----	----------	------------

антитела	антитела	НС		LC	
		ДНК	Пептид	ДНК	Пептид
mAb38067	REGN7541	17	18	19	20
mAb38072	REGN7544	33	34	35	36
mAb38090	REGN7548	50	51	52	53
mAb22034	H4H22034	70	71	72	73

Контрольные конструкции, использованные в следующих примерах

[0192] Следующая контрольная конструкция (анти-NPR1 антитело) была включена в эксперименты, описанные здесь, для сравнительных целей: «компаратор 1», моноклональное антитело против человеческого NPR1, имеющее последовательности VH/VL антитела «mAb5591» согласно патенту США № 20120114659 (Morphosys).

Пример 3: кинетика связывания с использованием системы Biacore моноклональных анти-NPR1 антител, связывающихся с различными соединениями NPR1, измеренная при 25°C и 37°C

Экспериментальная процедура

[0193] Константу равновесия диссоциации (K_D) для связывания различных соединений NPR1 с очищенными моноклональными анти-NPR1 антителами (mAb) определяли с использованием биосенсора Biacore 8k на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в режиме реального времени. Все исследования связывания проводили в подвижном буфере с 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05% поверхностно-активного вещества P20 (об./об.), pH 7,4 (HBS-EP) при 25°C и 37°C. Поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 сначала дериватизировали посредством сочетания аминов со специфическим антителом против человеческой Fc для захвата анти-NPR1 mAb. Исследования связывания проводили на внеклеточном домене NPR1 человека, экспрессированном с С-концевым мус-мус-гексагистидином (hNPR1-MMH; SEQ ID NO:74), внеклеточном домене NPR1 обезьяны, экспрессированном с С-концевым мус-мус-гексагистидином (mfNPR1-MMH; SEQ ID NO:75), внеклеточном домене NPR1 мыши, экспрессированном с С-концевым мус-мус-гексагистидином (mNPR1-MMH; SEQ ID NO:76), внеклеточном домене NPR1 собаки, экспрессированном с С-концевым мус-мус-гексагистидином (dog_NPR1-MMH; SEQ ID NO:77), внеклеточном домене NPR1 свиньи, экспрессированном с С-концевым мус-мус-гексагистидином (pig_NPR1-MMH; SEQ ID NO:78), и hNPR1-MMH+10× hANP.

[0194] Различные концентрации (40 нМ-0,625 нМ, 4-кратные серийные разведения) hNPR1-MMH, mfNPR1-MMH, hNPR1-MMH в присутствии 10-кратной концентрации hANP или фиксированную концентрацию (40 нМ) mNPR1-MMH, dog_NPR1-MMH, pig_NPR1-MMH готовили в подвижном буфере HBS-EP, и затем инжестировали в течение 150 с со скоростью потока 30 мкл/мин, одновременно контролировали диссоциацию mAb, связанных с различными соединениями NPR1, в течение 30 мин в подвижном буфере HBS-EP. В конце каждого цикла поверхность захвата анти-NPR1 mAb регенерировали с использованием 12-с инжестирования 10 mM фосфорной кислоты. Скорость ассоциации

(k_a) и скорость диссоциации (k_d) определяли подгонкой сенсограмм связывания в режиме реального времени к модели связывания 1:1 с ограничением переноса массы с использованием программного обеспечения для оценки Biacore Insight. Константу равновесия диссоциации при связывании (K_D) и полупериод диссоциации ($t^{1/2}$) рассчитывали по кинетическим скоростям как:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a} \text{ и } t^{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Параметры кинетики связывания для различных соединений NPR1, связывающихся с различными анти-NPR1 mAb по настоящему изобретению, при 25°C и 37°C приведены в таблицах 4-15.

Результаты

[0195] При 25°C моноклональные анти-NPR1 антитела связывались с hNPR1-ММН со значениями K_D в диапазоне от 47,4 пМ до 1,27 нМ, как показано в таблице 4.

Таблица 4

Параметры кинетики связывания различных анти-NPR1 mAb с hNPR1-ММН при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	40 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t^{1/2}$ (мин)
H4H22034N	59±0,4	34	3,26E+05	4,15E-04	1,27E-09	28
REGN7541	59±0,2	26	2,02E+05	6,80E-05	3,36E-10	170
REGN7544	60±0,4	29	2,81E+05	1,33E-05	4,74E-11	868
REGN7548	59±0,3	38	4,22E+05	3,40E-05	8,06E-11	340
Контрольный изотип	59±0,1	0	NB*	NB	NB	NB

*NB=связывание не детектировали

[0196] При 37°C моноклональные анти-NPR1 антитела связывались с hNPR1-ММН со значениями K_D в диапазоне от 57,4 пМ до 1,7 нМ, как показано в таблице 5.

Таблица 5

Параметры кинетики связывания различных анти-NPR1 mAb с hNPR1-ММН при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	40 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	71±0,3	44	6,26E+05	1,06E-03	1,70E-09	11
REGN7541	69±0,4	41	7,47E+05	1,34E-04	1,79E-10	86
REGN7544	72±0,2	43	5,69E+05	3,27E-05	5,74E-11	353
REGN7548	71±0,3	50	7,77E+05	6,60E-05	8,49E-11	175
Контрольный изотип	73±0,1	0	NB*	NB	NB	NB

*NB=связывание не детектировали

[0197] При 25°C моноклональные анти-NPR1 антитела связывались с mfNPR1-ММН со значениями K_D в диапазоне от 69 пМ до 1,23 нМ, как показано в таблице 6.

Таблица 6

Параметры кинетики связывания различных анти-NPR1 mAb с mfNPR1-ММН при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	40 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	59±0,4	33	3,18E+05	3,92E-04	1,23E-09	29
REGN7541	59±0,2	26	2,11E+05	6,71E-05	3,18E-10	172
REGN7544	60±0,1	29	2,79E+05	2,02E-05	7,25E-11	571
REGN7548	59±0,2	38	4,19E+05	2,89E-05	6,90E-11	399
Контрольный изотип	59±0,1	1	NB*	NB	NB	NB

*NB=связывание не детектировали

[0198] При 37°C моноклональные анти-NPR1 антитела связывались с mfNPR1-ММН со значениями K_D в диапазоне от 53,6 пМ до 1,99 нМ, как показано в таблице 7.

Таблица 7

Параметры кинетики связывания различных анти-NPR1 mAb с mfNPR1-ММН при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захваченно	40 нМ связан	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
-----------------	--------------------	--------------	--------------	-------------	-----------	-----------------

	го mAb (RU)	ного Ag (RU)				
H4H22034N	71±0,3	37	5,04E+05	1,00E-03	1,99E-09	12
REGN7541	69±0,4	36	6,63E+05	1,04E-04	1,57E-10	111
REGN7544	72±0,1	36	5,48E+05	2,94E-05	5,36E-11	393
REGN7548	71±0,2	39	6,62E+05	6,49E-05	9,81E-11	178
Контрольный изотип	72 ± 0,1	0	NB*	NB	NB	NB

*NB=связывание не детектировали

[0199] При 25°C моноклональные анти-NPR1 антитела связывались с hNPR1-ММН в присутствии 10-кратной концентрации hANP со значениями K_D в диапазоне от 78,8 пМ до 500 пМ, как показано в таблице 8.

Таблица 8

Параметры кинетики связывания различных анти-NPR1 mAb с hNPR1-ММН в присутствии 10-кратной концентрации hANP при 25°C

Захваченно е mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	40 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	60±0,2	35	3,46E+05	1,73E-04	5,00E-10	67
REGN7541	60±0,2	23	2,19E+05	6,07E-05	2,77E-10	190
REGN7544	59±0	26	2,61E+05	4,83E-05	1,85E-10	239
REGN7548	61±0	39	5,52E+05	4,35E-05	7,88E-11	266
Контрольны й изотип	57±0,2	0	NB*	NB	NB	NB

*NB=связывание не детектировали

[0200] При 37°C моноклональные анти-NPR1 антитела связывались с hNPR1-ММН в присутствии 10-кратной концентрации hANP со значениями K_D в диапазоне от 642 пМ до 1,52 нМ, как показано в таблице 9.

Таблица 9

Параметры кинетики связывания различных анти-NPR1 mAb с hNPR1-ММН в присутствии 10-кратной концентрации hANP при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	40 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	75±0,2	42	4,71E+05	7,17E-04	1,52E-09	16
REGN7541	72±0,2	32	3,49E+05	3,78E-04	1,08E-09	31
REGN7544	69±0,2	34	4,26E+05	3,51E-04	8,25E-10	33
REGN7548	75±0,1	42	5,93E+05	3,80E-04	6,42E-10	30
Контрольный изотип	69±0,1	0	NB*	NB	NB	NB

*NB=связывание не детектировали

[0201] При 25°C только два моноклональных анти-NPR1 антитела связывались с pig_NPR1-ММН со значениями K_D в диапазоне от 35,8 нМ до 122 нМ, как показано в таблице 10.

Таблица 10

Параметры кинетики связывания различных анти-NPR1 mAb с pig_NPR1-ММН при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	40 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	60±0,1	0	NB	NB	NB	NB
REGN7541	60±0	0	NB	NB	NB	NB
REGN7544	59±0,1	2	5,58E+04	6,79E-03	1,22E-07	1,7
REGN7548	61±0,1	11	1,19E+05	4,27E-03	3,58E-08	2,7
Контрольный изотип	57±0	0	NB*	NB	NB	NB

*NB=связывание не детектировали

[0202] При 37°C только два моноклональных анти-NPR1 антитела связывались с pig_NPR1-ММН со значениями K_D в диапазоне от 42,1 нМ до 98,1 нМ, как показано в таблице 11.

Таблица 11

Параметры кинетики связывания различных анти-NPR1 mAb с pig_NPR1-ММН при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	40 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	75±0	0	NB	NB	NB	NB
REGN7541	73±0	0	NB	NB	NB	NB
REGN7544	69±0,3	5	9,65E+04	9,47E-03	9,81E-08	1,2
REGN7548	75±0,1	14	2,20E+05	9,27E-03	4,21E-08	1,2
Контрольный изотип	69±0,1	0	NB*	NB	NB	NB

*NB=связывание не детектировали

[0203] При 25°C или при 37°C ни одно из моноклональных анти-NPR1 антител не связывалось с mNPR1-ММН, как показано в таблице 12 и таблице 13 соответственно.

Таблица 12

Параметры кинетики связывания различных анти-NPR1 mAb с mNPR1-ММН при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	40 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	60	0	NB	NB	NB	NB
REGN7541	60	0	NB	NB	NB	NB
REGN7544	59	0	NB	NB	NB	NB
REGN7548	61	0	NB	NB	NB	NB
Контрольный изотип	57	0	NB*	NB	NB	NB

*NB=связывание не детектировали

Таблица 13

Параметры кинетики связывания различных анти-NPR1 mAb с mNPR1-ММН при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	40 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
-----------------	-------------------------------	--------------------------	--------------	-------------	-----------	-----------------

H4H22034N	75	0	NB	NB	NB	NB
REGN7541	73	0	NB	NB	NB	NB
REGN7544	69	0	NB	NB	NB	NB
REGN7548	75	0	NB	NB	NB	NB
Контрольный изотип	69	0	NB*	NB	NB	NB

*NB=связывание не детектировали

[0204] При 25°C или при 37°C ни одно из моноклональных анти- NPR1 антител не связывалось с dog_NPR1-ММН, как показано в таблице 14 и таблице 15 соответственно.

Таблица 14

Параметры кинетики связывания различных анти-NPR1 mAb с dog_NPR1-ММН при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	40 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	60±0	0	NB	NB	NB	NB
REGN7541	60±0,1	0	NB	NB	NB	NB
REGN7544	59±0,2	0	NB	NB	NB	NB
REGN7548	61±0	0	NB	NB	NB	NB
Контрольный изотип	57±0	0	NB*	NB	NB	NB

*NB=связывание не детектировали

Таблица 15

Параметры кинетики связывания различных анти-NPR1 mAb с dog_NPR1-ММН при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	40 нМ связанного Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	75±0	0	NB	NB	NB	NB
REGN7541	73±0,3	0	NB	NB	NB	NB
REGN7544	69±0,2	0	NB	NB	NB	NB
REGN7548	75±0	0	NB	NB	NB	NB
Контрольный изотип	69±0,1	0	NB*	NB	NB	NB

*NB=связывание не детектировали

Пример 4: чувствительность от pH моноклональных анти-NPR1 антител, связывающихся с соединениями NPR1, измеренная при 37°C

Экспериментальная процедура

[0205] Константы скорости диссоциации (k_d) для различных моноклональных анти-NPR1 антител (mAb) в буферах с pH 7,4 и pH 6,0 определяли с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в режиме реального времени на основе биосенсора Biacore 4000. Все исследования связывания проводили при 37°C с использованием двух подвижных буферов: (i) PBS, 0,05% поверхностно-активного вещества твина-20 (об./об.), pH 7,4 (PBS-T-pH7,4) и (ii) PBS, 0,05% поверхностно-активного вещества твина-20 (об./об.), pH 6,0 (PBS-T-pH6,0). Поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 сначала дериватизировали посредством сочетания аминов со специфическим антителом против человеческой Fc для захвата анти-NPR1 mAb. Различные концентрации внеклеточного домена NPR1 человека, экспрессированного с С-концевым тус-тус-гексагистидином (hNPR1-ММН; SEQ ID NO:74), или внеклеточного домена NPR1 обезьяны, экспрессированного с С-концевым тус-тус-гексагистидином (mfNPR1-ММН; SEQ ID NO:75) (30 нМ и 10 нМ), готовили в буфере PBS-T-pH7,4, инжектировали со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 4 мин с последующей диссоциацией связанных соединений NPR1 в подвижных буферах PBS-T-pH7,4 или PBS-T-pH6,0 в течение 5 мин.

[0206] Константы скорости диссоциации (k_d) в двух подвижных буферах с различным pH определяли подгонкой сенсограмм связывания в режиме реального времени к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для подбора кривых Scrubber 2.0c. Полу период диссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали на основе значений k_d как:

$$t_{1/2} \text{ (мин)} = \frac{\ln(2)}{k_d}$$

Результаты

[0207] Значения k_d и $t_{1/2}$ для различных анти-NPR1 mAb, связывающихся с hNPR1-ММН или mfNPR1-ММН в PBS-T, pH 7,4, с последующей диссоциацией в PBS-T-pH7,4 или PBS-T-pH6,0 по изобретению при 37°C приведены в таблицах 16-19.

Таблица 16

Связывание различных моноклональных анти-NPR1 антител (mAb) с hNPR1-ММН в буфере PBS-T-pH7,4 и диссоциация в буфере PBS-T-pH7,4 при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	30 нМ связанного Ag (RU)	k_d (1/с)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	310±1,5	150	7,67E-04	15
REGN7541	326±0,4	170	7,34E-05	157
REGN7544	359±1,1	192	4,24E-05	273

REGN7548	356±1,4	215	6,58E-05	176
Контрольный изотип	340±1,4	2	NB*	NB

*NB=связывание не детектировали

Таблица 17

Связывание различных моноклональных анти-NPR1 антител (mAb) с hNPR1-ММН в буфере PBS-T-pH7,4 и диссоциация в буфере PBS-T-pH6,0 при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	30 нМ связанного Ag (RU)	k_d (1/с)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	349±0,6	172	1,38E-04	83
REGN7541	369±0,5	193	5,31E-05	217
REGN7544	368±1,1	193	1,58E-05	731
REGN7548	366±1,3	219	1,65E-05	702
Контрольный изотип	344±0,9	2	NB*	NB

*NB=связывание не детектировали

Таблица 18

Связывание различных моноклональных анти-NPR1 антител (mAb) с mfNPR1-ММН в буфере PBS-T-pH7,4 и диссоциация в буфере PBS-T-pH7,4 при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	30 нМ связанного Ag (RU)	k_d (1/с)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	308±0,2	139	7,81E-04	15
REGN7541	322±0,5	158	9,48E-05	122
REGN7544	356±1,2	178	3,55E-05	325
REGN7548	354±0,8	203	6,22E-05	186
Контрольный изотип	340±2,2	1	NB*	NB

*NB=связывание не детектировали

Таблица 19

Связывание различных моноклональных анти-NPR1 антител (mAb) с mfNPR1-ММН в буфере PBS-T-pH7,4 и диссоциация в буфере PBS-T-pH6,0 при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захваченного mAb (RU)	30 нМ связанного Ag (RU)	k_d (1/с)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H22034N	336±8,2	157	1,54E-04	75
REGN7541	367±0,5	179	6,94E-05	166
REGN7544	363±1,9	181	1,50E-05	768
REGN7548	363±0,8	207	2,67E-05	433
Контрольный изотип	336±4,4	2	NB*	NB

*NB=связывание не детектировали

Пример 5: оценка перекрестной конкуренции с использованием аналитической системы Octet между различными моноклональными анти-NPR1 антителами

Экспериментальная процедура

[0208] Конкуренцию за связывание между различными моноклональными анти-NPR1 антителами (mAb) определяли с использованием анализа бислойной интерферометрии (BLI) без меток в режиме реального времени на биосенсорной платформе Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 1 мг/мл BSA, 0,02% NaN₃, 0,05% поверхностно-активного вещества твина-20 (об./об.), pH 7,4 (HBS-EBT) при встряхивании планшетов со скоростью 1000 об/мин. Для оценки того, насколько два антитела способны конкурировать друг с другом за связывание с соответствующими эпитопами на рекомбинантном внеклеточном домене NPR1 человека, экспрессированном с С-концевым тус-тус-гексагистидином (hNPR1-ММН; SEQ ID NO:74), примерно 0,64 нМ hNPR1-ММН сначала захватывали на наконечниках биосенсора Octet, покрытых анти-Penta-His антителом (ForteBio Inc, № 18-5122), погружая кончики биосенсоров в лунки, содержащие 40-50 мкг/мл раствора hNPR1-ММН, на 60 с.

[0209] Наконечники биосенсора с захваченным антигеном затем насыщали первым моноклональным анти-NPR1 антителом (далее по тексту относится к mAb-1) посредством погружения в лунки, содержащие раствор mAb-1 с концентрацией 50 мкг/мл, на 4 мин. Затем наконечники биосенсоров погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора второго моноклонального анти-NPR1 антитела (далее по тексту относится к mAb-2) на 3 мин. Наконечники биосенсоров промывали буфером HBS-EBT между каждой стадией эксперимента. Ответную реакцию связывания контролировали в режиме реального времени в течение всего эксперимента и регистрировали ответную реакцию связывания в конце каждой стадии.

Результаты

[0210] Ответную реакцию связывания mAb-2 с hNPR1-ММН, предварительно комплексованным с mAb-1, сравнивали с ответом на связывание, когда порядок изменяли на обратный (связанное первое антитело mAb-2, связанное второе антитело mAb-1) и конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных анти-NPR1 антител определяли, как показано в таблице 20.

Таблица 20

Перекрестная конкуренция между различными моноклональными анти-NPR1 антителами за связывание с hNPR1-ММН

mAb-1	mAb-2, конкурирующее с mAb-1
H4H22034N	H4H22034N
	REGN7541
	REGN7544
	REGN7548
REGN7541	H4H22034N
	REGN7541
	REGN7544
	REGN7548
REGN7544	H4H22034N
	REGN7541
	REGN7544
	REGN7548
REGN7548	H4H22034N
	REGN7541
	REGN7544
	REGN7548

Пример 6: оценка антагонизма к NPR1 антагонистических анти-NPR1 антител

Экспериментальная процедура

[0211] Для оценки регуляции рецептора натрийуретического пептида 1 человека (hNPR1) была создана клеточная линия HEK293, стабильно экспрессирующая hNPR1 (аминокислоты от M1 до G1061, идентификационный номер #NP_000897.3) с С-концевыми метками мус и FLAG и сортировали клетки с высоким уровнем экспрессии hNPR1. Полученную клеточную линию назвали HEK293/hNPR1.MycDDK HS, сокращенно HEK293/hNPR1, и поддерживали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, NEAA, смесь

пенициллин/стрептомицин/глутамин и 500 мкг/мл G418 сульфата. Связывание лиганда с NPR1 активирует домен рецептора с гуанилатциклазной активностью, который катализирует продукцию cGMP из GTP (Zois et al., 2014, Natriuretic peptides in cardiometabolic regulation and disease. Nature Publishing Group, 11(7), 403-412). Для оценки активности NPR1 использовали анализ гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF), с помощью которого определяют уровни cGMP.

Анализ антагонизма к NPR1

[0212] Для оценки антагонизма к NPR1 клетки HEK293/hNPR1 высевали в 96-луночные планшеты (96-Well Half-Area) из расчета 20000 клеток/луночку в полной питательной среде и культивировали в течение ночи. На следующие сутки питательную среду заменяли буфером для разведения (OptiMEM с 0,1% FBS), содержащим анти-NPR1 антитело или антитело контрольного изотипа в диапазоне концентраций (0,017 нМ - 1 мкМ, с включением дополнительного условия без антитела) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. После предварительной обработки клетки HEK293/hNPR1 стимулировали лигандом, ANP или BNP, в диапазоне концентраций (ANP=0,002-2 нМ или BNP=0,0039-4 нМ, с включением дополнительного условия без лиганда), приготовленным в буфере для разведения или буфере для разведения, содержащем 0,2 нМ ANP или 0,7 нМ BNP, и инкубировали при 37°C в течение 30 мин.

[0213] Анализ HTRF проводили с использованием набора cGMP HTRF (Cisbio, #62GM2PEH) в соответствии с инструкциями производителя. Интенсивность флуоресценции определяли с использованием микропланшетного ридера EnVision multilabel (Perkin Elmer), и соотношение резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) рассчитывали в соответствии с инструкциями производителя. Соотношения FRET преобразовали в концентрации cGMP в логарифмической шкале в соответствии со стандартной кривой cGMP и анализировали с использованием 4-параметрического логистического уравнения на 10-точечной кривой концентрация-ответ для получения значений полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) для анти-NPR1 антител с использованием GraphPad Prism 8. Значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) лиганда не рассчитывали за счет ограничения количественного определения при высоких концентрациях. Максимальное ингибирование рассчитывали по уравнению, представленному ниже:

$$\% \text{ Максимальное ингибирование} = \frac{[\text{Log cGMP, M}]_{0,2 \text{ нМ ANP или } 0,7 \text{ нМ BNP}} - [\text{Log cGMP, M}]_{1 \text{ мкМ тестируемого антитела с лигандом}}}{[\text{Log cGMP, M}]_{0,2 \text{ нМ ANP или } 0,7 \text{ нМ BNP}} - [\text{Log cGMP, M}]_{\text{исходный уровень}}} \times 100$$

[0214] В этом уравнении [Log cGMP, M]_{исходный уровень}, [Log cGMP, M]_{1 мкМ тестируемое антитело с лигандом} и [Log cGMP, M]_{0,2 нМ ANP или 0,7 нМ BNP} представляют собой значения концентрации cGMP в логарифмической шкале из клеток, обработанных только буфером для разведения, наиболее высокая концентрация анти-NPR1 антител составляла 1 мкМ с 0,2 нМ ANP или 0,7 нМ BNP и только с 0,2 нМ ANP или 0,7 нМ BNP соответственно.

Определение характера антагонизма к NPR1

[0215] Характер ингибирования ANP-опосредованной активации NPR1 анти-NPR1

антителами оценивали с использованием анализа Шильда (Kenakin, 1997, Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven) на основе анализа накопления cGMP. Условия оптимизировали таким образом, чтобы кривые зависимости концентрации ANP-ответ находились в линейном диапазоне стандартной кривой для cGMP. Вкратце, клетки HEK293/hNPR1 снимали с планшетов с использованием раствора для диссоциации клеток, не содержащего ферментов. Затем клеточную суспензию пересеивали в 96-луночные планшеты (96-well low-volume plates) из расчета 1000 клеток/лунку в буфере для разведения. Затем клетки предварительно обрабатывали анти-NPR1 антителами в буфере для разведения при фиксированной концентрации 0, 50, 150 или 450 нМ в течение 15 мин при комнатной температуре. После предварительной обработки к клеткам добавляли ANP в диапазоне концентраций (от 1,0 пМ до 1 мкМ) в буфере для разведения (с включением дополнительного условия без ANP) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин.

[0216] Анализ HTRF, определение интенсивности флуоресценции и расчет концентрации cGMP проводили, как описано ранее. При использовании 96-луночных планшетов (96-well low-volume plates), объемы, необходимые для построения стандартной кривой cGMP и реагентов для детектирования, были вдвое меньше, чем при использовании 96-луночных планшетов (96-well low-volume plates).

[0217] Все параметры анализа анализировали с использованием GraphPad Prism 8. Значения EC₅₀ ANP в присутствии или в отсутствии анти-NPR1 антител рассчитывали с использованием 4-параметрического логистического уравнения по 11-точечной кривой концентрация-ответ. Снижение максимального ответа ANP под действием анти-NPR1 антител рассчитывали по уравнению:

% Максимальное ответное снижение ANP

$$= \frac{[\text{Log cGMP}, M]_{1\mu\text{M ANP}} - [\text{Log cGMP}, M]_{1\mu\text{M ANP с } 45\text{ нМ антагониста}}}{[\text{Log cGMP}, M]_{1\mu\text{M ANP}} - [\text{Log cGMP}, M]_{\text{исходный уровень}}} \times 100$$

[0218] Наклон регрессии Шильда определяли с использованием анализа графика Шильда, полученного построением графика Log(отношение концентраций - 1) на оси Y против концентраций антагонистов в логарифмической шкале на оси X. Отношение концентрации определяют как значения EC₅₀ ANP в присутствии антагониста в различных концентрациях, деленное на значение EC₅₀ ANP в отсутствии антагониста.

Анализ интернализации, опосредованной анти-NPR1 антителом, с использованием конъюгатов вторичное антитело-лекарственное средство в клеточном анализе цитотоксичности

[0219] Интернализацию анти-NPR1 антител опосредованно оценивали с помощью анализа цитотоксичности с использованием вторичного антитела, конъюгированного с цитотоксической полезной нагрузкой, монометилауристатином F (MMAF). После связывания NPR1 с клетками анти-NPR1 антитело будет интернализироваться с рецептором, что приведет к совместной интернализации конъюгата вторичного антитела

против человеческого Fc fab-лекарственного средства (вторичный ADC), высвобождению конъюгированной цитотоксической полезной нагрузки и киллингу клеток. Следовательно, степень цитотоксичности можно использовать для оценки способности антитела интернализироваться при взаимодействии с мишенью.

[0220] Для анализа клетки HEK293/hNPR1 высевали в 96-луночные белые планшеты из расчета 1000 клеток/лунку в полной питательной среде и культивировали в течение ночи. На следующие сутки клетки предварительно обрабатывали анти-NPR1 антителом или контрольным антителом в диапазоне концентраций (серийные разведения от 914 фМ до 6 пМ в буфере для разведения, с включением дополнительного условия без антител) в присутствии или в отсутствии 100 нМ ANP или 100 нМ BNP в течение 5 мин при 37°C. После предварительной обработки к клеткам HEK293/hNPR1 добавляли вторичный ADC в конечной концентрации 20 нМ. Для оценки максимального киллинга в анализе в контрольные лунки добавляли дигитонин в конечной концентрации 48 мкг/мл. Обработанные клетки инкубировали при 37°C в течение трех суток.

[0221] Для оценки жизнеспособности клеток использовали набора для определение жизнеспособности клеток Promega CellTiter-Glo в соответствии с инструкциями производителя. Интенсивность люминесценции определяли с помощью микропланшетного ридера EnVision multilabel и анализировали с использованием 4-параметрического логистического уравнения на 9-точечной кривой концентрация-ответ для получения значений IC₅₀ анти-NPR1 антител с использованием GraphPad Prism 8. Процентную жизнеспособность клеток или киллинг клеток рассчитывали с использованием уравнений, приведенных ниже:

$$\% \text{ жизнеспособность} = \frac{RLU_{\text{буфер для разведения}} \cdot 100 \text{ нМ ANP или } 100 \text{ нМ BNP одного} - RLU_{6 \text{ нМ тестируемого антитела}}}{RLU_{\text{буфер для разведения}} \cdot 100 \text{ нМ ANP или } 100 \text{ нМ BNP одного} - RLU_{\text{дигитонин}}} \times 100$$

$$\% \text{ Киллинг} = 100 - \% \text{ жизнеспособность}$$

Результаты

Оценка ингибирования лиганд-опосредованной активации NPR1 анти-NPR1 антителами

[0222] Оба ANP и BNP активировали клетки HEK293/hNPR1, стимулируя накопление cGMP в зависимости от концентрации (фиг. 1A и 1B). Все анти-NPR1 антитела достоверно блокировали индуцированную 0,2 нМ ANP или 0,7 нМ BNP активацию NPR1 со значениями IC₅₀ 7,0-51 нМ и максимальным ингибированием на уровне 82%-107% (фиг. 1A и 1B и таблица 21). Антитело контрольного изотипа не демонстрировало какого-либо достоверного ингибирования индуцированной 0,2 нМ ANP или 0,7 нМ BNP активации NPR1 (фиг. 1A и 1B и таблица 21).

Таблица 21

Анти-NPR1 антитела достоверно ингибировали лиганд-индуцированную активацию NPR1, как определено с использованием анализа накопления cGMP

Антитело	С 0,2 нМ ANP		С 0,7 нМ BNP	
	IC ₅₀ , М	Максимальное ингибирование, %	IC ₅₀ , М	Максимальное ингибирование, %
H4H22034N	2.00E-08	82	1,33E-08	99
REGN7541	4.41E-08	90	1,49E-08	100
REGN7544	5.13E-08	92	1,63E-08	107
REGN7548	1.91E-08	92	7,02E-09	103
Контрольное mAb	ND	-1	ND	-9

ND: не определяли за счет отсутствия изменений в сигнале, зависящих от концентрации;
Max Inh.: максимальное ингибирование

[0223] В совокупности, H4H22034N, REGN7541, REGN7544 и REGN7548 показали достоверное ингибирование индуцированной лигандом активации NPR1, как определено с использованием анализа накопления cGMP.

Оценка характера, с помощью которого анти-NPR1 антитела ингибируют ANP-опосредованную активацию NPR1

[0224] Анализ Шильда проводили для определения характера ингибирования ANP-опосредованной активации NPR1 анти-NPR1 антителами. В анализе параллельный сдвиг вправо кривых «концентрация-ответ» агониста с наклоном Шильда ~1 без изменения максимального ответа указывает на наличие конкурентного антагониста. В противоположность, непараллельный сдвиг вправо кривых «концентрация-ответ» агониста с наклоном Шильда, не близким к единице, указывает на неконкурентного антагониста. Антагонист, который может изменить максимальную ответную реакцию агониста, определяется как необратимый антагонист, тогда как антагонист, который не меняет максимальную реакцию агониста, определяется как обратимый антагонист (Kenakin, 1997).

[0225] С использованием анализа Шильда H4H22034N, REGN7541, REGN7544 и REGN7548 демонстрировали неконкурентное ингибирование агониста ANP в анализе накопления cGMP (фиг. 2А-2Е). Повышение концентрации четырех анти-NPR1 антител привело к непараллельному сдвигу вправо кривых зависимости концентрации ANP с наклоном Шильда, близким к 1. Кроме того, ингибирование H4H22034N не изменило максимальный ответ ANP, в то время как ингибирование под действием REGN7541, REGN7544 и REGN7548 снижало максимальный ответ ANP до 10-62% (фиг. 2А-2Е и таблица 22).

Таблица 22

Анти-NPR1 антитела показали неконкурентный антагонизм в анализе

Шильда

Антитело	Наклон регрессии Шильда	% максимальное снижение ANP
H4H22034N	0,05	0,1
REGN7541	2,0	25,5
REGN7544	2,6	61,6
REGN7548	1,4	10,0

[0226] В совокупности H4H22034N, REGN7541, REGN7544 и REGN7548 демонстрировали неконкурентный антагонизм с различными эффектами на максимальный ответ на лиганд.

Оценка интернализации NPR1, индуцированной анти-NPR1 антителами

[0227] Интернализацию анти-NPR1 антител оценивали с использованием анализа цитотоксичности, опосредованной вторичным ADC, в присутствии или в отсутствие лиганда. В отсутствие лиганда все анти-NPR1 антитела индуцировали интернализацию NPR1 в зависимости от концентрации со значениями IC₅₀ 58-243 пМ и максимального киллинга на уровне 82%-85% (фиг. 3А-3С и таблица 23). В присутствии 100 нМ лиганда анти-NPR1 антитела индуцировали интернализацию NPR1 со значениями IC₅₀ 132-703 пМ и максимальным киллингом 50%-82%. Антитело контрольного изотипа не демонстрировало какой-либо значительной интернализации NPR1 в присутствии или в отсутствие лиганда (фиг. 3А-3С и таблица 23).

Таблица 23

Интернализация анти-NPR1 антител в присутствии или в отсутствие лиганда, как определено с использованием анализа цитотоксичности, опосредованной вторичным ADC

Антитело	Без лиганда		С 100нМ ANP		С 100нМ BNP	
	IC ₅₀ , М	Максимальный киллинг, %	IC ₅₀ , М	Максимальный киллинг, %	IC ₅₀ , М	Максимальный киллинг, %
H4H22034N	5.84E-11	85	1.85E-10	82	1.32E-10	82
REGN7541	1.95E-10	83	6.67E-10	60	5.55E-10	78
REGN7544	2.43E-10	82	7.03E-10	50	6.77E-10	74
REGN7548	8.69E-11	85	3.97E-10	74	2.95E-10	79
Контрольное mAb	ND	0.01	ND	-4	ND	0.5

ND: не определяли за счет отсутствия изменений в сигнале, зависящих от концентрации

[0228] В совокупности, H4H22034N, REGN7541, REGN7544 и REGN7548 показали интернализацию NPR1 анти-NPR1 антителом в присутствии или в отсутствие лиганда, как определено анализом цитотоксичности, опосредованной вторичным ADC.

Пример 7: активность и специфичность анти-NPR1 антител, связывающихся с NPR1 одним или в комплексе с ANP или BNP на клеточной поверхности, с использованием электрохемилюминесцентного детектирования

Экспериментальная процедура

[0229] Активность моноклональных анти-человеческий NPR1 антител связываться с клетками, экспрессирующими NPR1 человека или обезьяны (*Macaca fascicleis*) (hNPR1 или mfNPR1), в присутствии или в отсутствие лигандов, предсердного натрийуретического пептида человека (ANP) или мозгового натрийуретического пептида человека (BNP), определяли с использованием иммуноанализа на основе электрохемилюминесценции (ECL).

[0230] Вкратце, клетки, экспрессирующие HEK293/hNPR1, получали трансфекцией клеток эмбриональной почки человека (HEK) 293 устойчивой к неомицину плазмидой pLVX.hNPR1.myc.DDK, кодирующей NPR1 человека (аминокислоты M1-G1061,

UniProtKB - P16066). Аналогичным образом, клетки HEK293/mfNPR1 получали трансфекцией клеток HEK293 устойчивой к неомицину плазмидой pRG984, кодирующей полноразмерный NPR1 обезьяны (аминокислоты M1-G1061, идентификационный номер XP_005541809.1). Нетрансфектированную клеточную линию HEK293, которая не показывала детектируемого связывания коммерческого анти-hNRP1 антитела методом активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS), включали в эксперимент в качестве контроля неспецифического связывания.

[0231] Эксперименты проводили согласно следующей процедуре. Культуры клеточных линий, описанных выше, промывали один раз буфером $1 \times \text{PBS}$ без $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ и инкубировали в течение 10 мин при 37°C с раствором для диссоциации клеток, не содержащим ферментов (Enzyme Free Cell Dissociation Solution), для отделения клеток от колбы. Собранные клеточные осадки один раз промывали и ресуспендировали в $1 \times \text{PBS}$ с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, и затем подсчитывали количество клеток с использованием счетчика клеток Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). Примерно $2,0 \times 10^4$ клеток на лунку высевали на 96-луночные планшеты с углеродными электродами (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C . Сайты неспецифического связывания блокировали с использованием 2% BSA (мас./об.) в $1 \times \text{PBS}$, содержащем $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки HEK293/hNPR1 и HEK293/mfNPR1 инкубировали в течение 0,5 ч при комнатной температуре с 10 нМ hANP (Tocris, Minneapolis, MN), 100 нМ hBNP (Tocris, Minneapolis, MN) или только с буфером для разведения образцов, в то время как клетки HEK293 обрабатывали только буфером для разведения образцов. Без промывания к клеткам добавляли серийные разведения анти-NPR1, компаратора 1 или антитела контрольного изотипа в диапазоне от 1,7 пМ до 100 нМ или буфер, не содержащий антитела, с последующей инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали для удаления несвязавшихся антител, hANP и hBNP с использованием устройства для промывки планшетов AquaMax2000 с насадкой для промывки клеток (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA). Связанные с планшетом антитела детектировали с использованием SULFO-TAG™-конъюгированного поликлонального козьего антитела против IgG человека, специфичного в отношении тяжелых и легких цепей (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), которое инкубировали с клетками в течение 1 ч при комнатной температуре.

[0232] После промывки планшеты обрабатывали Read Buffer (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD) в соответствии с рекомендованной производителем процедурой и регистрировали люминесцентные сигналы на визуализирующей системе SECTOR Imager 600 (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Сигналы связывания в единицах RLU анализировали как функцию концентрации антител, и строили график на основе сигмоидальной (четырёхпараметрической логистической) модели «доза-ответ» с использованием статистического пакета R (с открытым исходным кодом). Значение EC_{50} , определяемое как концентрация антитела, при которой имеет место 50% от максимального

сигнала связывания, было определено для указания активности связывания анти-NPR1 антител с клетками, экспрессирующими NPR1, с или без ANP или BNP в комплексе с NPR1 на клеточной поверхности.

Результаты

[0233] Активность моноклональных анти-NPR1 антител специфически связываться с поверхностью клеток HEK293, сконструированных для экспрессии NPR1 человека или обезьяны в присутствии или в отсутствии ANP или BNP, оценивали с использованием иммуноанализа на основе электрохемилюминесценции. Анализировали концентрационную зависимость связывания антител и определяли значения EC_{50} . Результаты обобщены в таблице 24.

Таблица 24

Активность связывания анти-NPR1 антител с клетками, экспрессирующими NPR1, в присутствии или в отсутствии лигандов NPR1

Антитело	Опыт	Активность связывания с клетками, EC_{50} (M)					
		HEK293/hNPR1			HEK293/mfNPR1		
		Без добавленного лиганда	+10 нМ hANP	+100 нМ hBNP	Без добавленного лиганда	+10 нМ hANP	+100 нМ hBNP
H4H22034	1	3,4E-10	5,6E-10	4,3E-10	3,3E-10	6,7E-10	4,2E-10
REGN7541	1	1,3E-09	2,1E-09	1,1E-09	1,4E-09	2,9E-09	9,2E-10
REGN7544	1	1,7E-09	2,9E-09	1,5E-09	1,7E-09	4,2E-09	1,7E-09
REGN7548	2	6,8E-10	1,2E-09	8,1E-10	5,6E-10	1,2E-09	5,6E-10
Компаратор 1	2	NB	5,7E-10	1,8E-09	NB	INC	INC
Контрольный изотип	2	NB	NB	NB	NB	NB	NB

Сокращения: NB - связывание отсутствовало; INC - отсутствие результата: значение EC_{50} невозможно было рассчитать за счет отсутствия данных по сигмоидальной кривизне, которые можно было бы использовать с сигмоидальной моделью «доза-ответ» (подгонка сигмоидальной кривой по 4 параметрам), но антитело демонстрировало незначительное

специфическое связывание с клетками, экспрессирующими mfNPR1, в присутствии 10 нМ hANP или 100 нМ hBNP

[0234] Четыре анти-NPR1 антитела (H4H22034, REGN7541, REGN7544, REGN7548) по настоящему изобретению связывались со сконструированными клетками с человеческим NPR1 в присутствии 10 нМ hANP или 100 нМ hBNP. Активность этих антител на клетках HEK293/hNPR1.myc.DDK в присутствии 10 нМ hANP или 100 нМ hBNP варьировалась со значениями EC_{50} от 0,56 до 2,9 нМ или от 0,43 до 1,5 нМ соответственно (таблица 24). Аналогичную активность связывания определяли на клетках, экспрессирующих hNPR1, в отсутствии hANP и hBNP, где значения EC_{50} находились в диапазоне от 0,34 нМ до 1,7 нМ. Не наблюдали какого-либо детектируемого связывания этих антител с родительскими клетками HEK293 в тех же экспериментальных условиях. Полученные результаты позволяют предположить, что антитела являются специфическими связывающими агентами NPR1 и что на активность связывания NPR1 человека с этими антителами не влияет присутствие ANP или BNP.

[0235] Напротив, компаратор 1 проявлял специфичность связывания с клетками hNPR1 только тогда, когда присутствовали hANP или hBNP (10 нМ hANP или 100 нМ hBNP), со значениями EC_{50} 0,57 нМ и 1,8 нМ соответственно, и не наблюдалось детектируемого связывания в отсутствии hANP и hBNP, следовательно, его можно классифицировать в качестве агента, связывающегося только с комплексом NPR1-ANP/BNP.

[0236] Анти-NPR1 антитела H4H22034, REGN7541, REGN7544, REGN7548 также связывались с клетками, экспрессирующими NPR1 обезьяны (HEK293/mfNPR1), со значениями EC_{50} в диапазоне от 0,33 нМ до 1,7 нМ. Подобно клеткам hNPR1, добавление 10 нМ hANP или 100 нМ hBNP не оказывало влияния на связывание анти-NPR1 антитела с клетками HEK293/mfNPR1; значения EC_{50} для связывания антитела находились в диапазоне от 0,67 нМ до 4,2 нМ или от 0,42 нМ до 1,7 нМ в присутствии hANP и hBNP соответственно (таблица 24), и связывание не было обнаружено ни для одного из антител на родительских клетках HEK293. Напротив, компаратор 1 специфически связывался со сконструированными клетками HEK293/mfNPR1 только в присутствии 10 нМ hANP или 100 нМ hBNP, однако значения EC_{50} невозможно было определить за счет того, что зависящая от концентрации кривая связывания не имела сигмоидальной кривизны, и данные не могли быть сопоставлены с моделью подгонки.

[0237] В эксперименте контрольный изотип не связывался с клетками HEK293/hNPR1, HEK293/mfNPR1 и HEK293.

Пример 8: характеристика немедленных эффектов на системное артериальное давление после однократного внутривенного введения 25 мг/кг антагонистического анти-NPR1 mAb у мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем

Экспериментальная процедура

[0238] Целью данного исследования была оценка немедленных эффектов

антагонистических анти-NPR1 антител на исходное системное артериальное давление у мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением, измеренного с телеметрическим контролем. Мышам-самцам NPR1^{hu/hu} (n=30) в возрасте ~14-16 недель имплантировали телеметры PAC10 (DSI, St. Paul, MN) и давали возможность восстановиться в течение, по меньшей мере, 7 суток. Животных разделяли на группы (группы 1-5) в зависимости от массы тела (таблица 25). Животных содержали индивидуально в стандартных условиях (температура от 64°F до 84°F (от 18°C до 29°C); относительная влажность от 30% до 70%), и поддерживали режим 12-ч свет/12-ч темнота. Корм (стандартный корм в виде гранул Research Diets) и воду давали вволю.

Таблица 25

Обобщенная информация по дозам и группам доз

Номер группы	Опытный или контрольный образец	Уровень дозы (мг/кг/доза)	Объемная доза (мл/кг)	Число животных
				Самцы
1	PBS	0	5	6
2	H4H22034N	25		6
3	REGN7541			6
4	REGN7544			6
5	REGN7548			6

[0239] Тестируемые белки вводили соответствующим животным путем однократной внутривенной инъекции на сутки 0. Объемная доза для каждого животного основывалась на последнем измерении массы тела.

[0240] Систолическое давление, диастолическое давление, среднее артериальное давление, пульсовое давление и частоту сердечных сокращений регистрировали в течение 10 с каждую минуту в течение периода тестирования. Данные телеметрии представлены в виде средних значений за 60 мин или за 24 ч. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SEM.

Результаты

[0241] Оценка *in vivo* показала, что по сравнению с контролем PBS у животных, которым вводили антагонистическое анти-NPR1 антитело, наблюдали быстрое и стойкое повышение системного артериального давления (фиг. 4) после однократного внутривенного введения любого из тестируемых антител. Изменения давления имели место почти сразу же (фиг. 4) и продолжались до суток 7 исследования, то есть в течение всего эксперимента (фиг. 5). Величина немедленного повышения артериального давления, оцененная по среднему изменению (через 48 ч после введения дозы) систолического артериального давления от исходного уровня, колебалась от +7,64 \pm 1,13 (REGN7541) до +9,81 \pm 1,03 (H4H22034N) мм рт.ст. Величина повышения кровяного давления, оцененная по среднему изменению (через 7 суток после введения дозы) систолического артериального

давления по сравнению с исходным уровнем, колебалась от $+7,65 \pm 1,03$ (REGN7548) до $+9,55 \pm 1,16$ (H4H22034N) мм рт.ст.

[0242] Диастолическое, среднее артериальное и пульсовое давление (таблица 26 и таблица 27) также достоверно изменялись после введения блокирующих NPR1 mAb, при этом величина и продолжительность эффекта соответствовали наблюдаемым и зарегистрированным изменениям для систолического артериального давления. Реакция со стороны частоты сердечных сокращений была различной (таблица 26 и таблица 27), при этом немедленные изменения обычно имели тенденцию к большему снижению частоты по сравнению с исходным уровнем. Эти изменения согласуются с наблюдаемым увеличением давления. Оценка частоты сердечных сокращений через 7 суток продемонстрировала достоверное относительное увеличение у животных, получивших REGN7548.

Таблица 26

Среднее изменение кровяного давления и частоты сердечных сокращений через 48 ч после введения дозы по сравнению с исходными значениями

Группа с дозой	Доза (мг/кг)	Систолическое давление (мм рт.ст.)	Диастолическое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериальное давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Частота сердечных сокращений (BPM)
PBS	0	$0,08 \pm 1,0$	$0,04 \pm 0,89$	$0,03 \pm 0,95$	$0,04 \pm 0,17$	- $10,02 \pm 6,85$
H4H22034 N	25	$9,81 \pm 1,03^{**}$ **	$4,30 \pm 0,89^{***}$ *	$7,22 \pm 0,96^*$ ***	$5,51 \pm 0,21$ ****	- $22,80 \pm 6,75$
REGN7541		$7,64 \pm 1,13^{**}$ **	$3,01 \pm 0,95^{***}$ *	$5,62 \pm 1,04^*$ ***	$4,55 \pm 0,28$ ****	- $14,38 \pm 8,59$
REGN7544		$8,68 \pm 1,03^{**}$ **	$3,79 \pm 0,94^{***}$ *	$6,42 \pm 0,98^*$ ***	$4,89 \pm 0,22$ ****	- $17,91 \pm 7,22$
REGN7548		$7,87 \pm 1,08^{**}$ **	$2,78 \pm 0,94^{***}$ ***	$5,55 \pm 1,01^*$ ***	$5,09 \pm 0,22$ ****	- $11,44 \pm 6,73$

Мышей $NPR1^{hu/hu}$ с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным проводили однократную внутривенную инъекцию 25 мг/кг антагонистического анти-NPR1 mAb или PBS, как показано в таблице 25. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, $n=6$ на группу. Статистика - двусторонний дисперсионный анализ с критерием Даннета; $*p<0,05$ по сравнению с PBS

Таблица 27

Среднее изменение кровяного давления и частоты сердечных сокращений через 7 суток после введения дозы по сравнению с исходными значениями

Группа с дозой	Доза (мг/кг)	Систолическое давление (мм рт.ст.)	Диастолическое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериальное давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Частота сердечных сокращений (BPM)
PBS	0	-0,82 \pm 0,24	-0,26 \pm 0,17	-0,66 \pm 0,20	- 0,56 \pm 0,15	-21,98 \pm 3,75
H4H22034N	25	9,55 \pm 1,16 ****	4,79 \pm 0,49* ***	7,19 \pm 0,83* ***	4,76 \pm 0,70****	-22,75 \pm 3,93
REGN7541		8,89 \pm 1,54 ****	5,44 \pm 1,12* ***	7,19 \pm 1,27* ***	3,45 \pm 0,64***	-18,41 \pm 4,51
REGN7544		7,97 \pm 1,03 ****	3,85 \pm 0,64* ***	5,96 \pm 0,80* ***	4,12 \pm 0,63****	-22,53 \pm 4,89
REGN7548		7,65 \pm 1,03 ****	3,44 \pm 0,47* ***	5,66 \pm 0,75* ***	4,21 \pm 0,62****	- 9,54 \pm 3,25****

Мышей $NPR1^{hu/hu}$ с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным проводили однократную внутривенную инъекцию 25 мг/кг антагонистического анти-NPR1 mAb или PBS, как показано в таблице 25. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, $n=6$ на группу. Статистика - двусторонний дисперсионный анализ с критерием Даннета; $*p<0,05$ по сравнению с PBS

[0243] Антагонистические анти-NPR1 антитела, H4H22034N, REGN7541, REGN7544 и REGN7548, достоверно и быстро повышали системное артериальное давление в течение нескольких часов после однократной подкожной инъекции мышам $NPR1^{hu/hu}$ с

нормальным давлением. Наблюдаемые гемодинамические эффекты сохранялись на протяжении 7-суточного эксперимента.

Пример 9: характеристика влияния на системное артериальное давление однократной дозы 1 или 25 мг/кг антагонистического анти-NPR1 mAb у мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением

Экспериментальная процедура

[0244] Целью данного исследования было оценка влияния антагонистических анти-NPR1 антител на исходное системное артериальное давление у мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем. Мышам-самцам NPR1^{hu/hu} (n=54) в возрасте ~20-24 недель имплантировали телеметры PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) и давали возможность восстановиться в течение по меньшей мере 7 суток. Животных распределяли на группы (группы 1-10) на основе массы тела и исходного систолического и пульсового давления (таблица 28). Животных содержали индивидуально в стандартных условиях (температура от 64°F до 84°F (от 18°C до 29°C); относительная влажность от 30% до 70%) и поддерживали режим 12-ч свет/12-ч темнота. Корм (стандартный корм в виде гранул Research Diets) и воду давали вволю.

Таблица 28

Обобщенная информация по дозам и группам доз

Номер группы	Опытный или контрольный образец	Уровень дозы (мг/кг/доза)	Объемная доза (мл/кг)	Число животных
				Самцы
1	PBS	0	5	5
2	mAb контрольного изотипа IgG4P	25		5
3	H4H22034N	1		5
4	REGN7541			5
5	REGN7544			5
6	REGN7548			5
7	H4H22034N	25		6
8	REGN7541			6
9	REGN7544			6
10	REGN7548			6

[0245] Тестируемые белки вводили соответствующим животным путем однократной подкожной инъекции на сутки 0. Объемная доза для каждого животного основывалась на последнем измерении массы тела.

[0246] Систолическое давление, диастолическое давление, среднее артериальное

давление, пульсовое давление и частоту сердечных сокращений регистрировали в течение 10 с каждые 10 мин в течение периода тестирования. Данные телеметрии представлены в виде средних 24-ч значений. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SEM.

Результаты

[0247] Характеристика антагонистических анти-NPR1 антител *in vivo* показала, что по сравнению с животными, получавшими изотип IgG4P и контрольный PBS, у мышей NPR1^{hu/hu}, получавших антагонист NPR1, отмечалось достоверное и стойкое повышение системного артериального давления после однократного подкожного введения дозы 1 или 25 мг/кг любого из тестируемых антагонистических анти-NPR1 антител (таблица 29, таблица 30, фиг. 6, фиг. 7). Величина повышения артериального давления после однократного подкожного введения дозы 1 мг/кг, оцененная по среднему изменению (от суток 0 до суток 14 после введения) систолического артериального давления по сравнению с исходным уровнем, колебалась от $+6,81 \pm 0,76$ (REGN7548) до $+11,22 \pm 0,93$ (REGN7541) мм рт. ст. (таблица 29 и фиг. 6). Величина повышения кровяного давления после однократного подкожного введения дозы 25 мг/кг, оцененная по среднему изменению (от суток 0 до 14 суток после введения) систолического артериального давления по сравнению с исходным уровнем, колебалась от $+8,82 \pm 0,64$ (H4H22034) до $+9,76 \pm 0,92$ (REGN7544) мм рт. ст. (таблица 29 и фиг. 7).

Таблица 29

Среднее изменение кровяного давления и частоты сердечных сокращений через 14 суток после введения дозы по сравнению с исходными значениями

Доза в группе	Доза (мг/кг)	Систолическое давление (мм рт.ст.)	Диастолическое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериальное давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Частота сердечных сокращений (BPM)
PBS	0	$1,69 \pm 0,23$	$-0,39 \pm 0,14$	$0,57 \pm 0,13$	$2,07 \pm 0,19$	$-6,52 \pm 2,45$
mAb контрольного изотипа IgG4P	25	$0,53 \pm 0,27^*$ ***	$0,26 \pm 0,26$	$-0,03 \pm 0,26$	$0,80 \pm 0,09$ ****	$-4,92 \pm 1,78$
H4H22034N	1	$7,10 \pm 0,60^*$ ***	$3,81 \pm 0,43^*$ ***	$5,55 \pm 0,51^*$ ***	$3,29 \pm 0,30$	$-16,51 \pm 3,24$
REGN7541		$11,22 \pm 0,93$ ****	$7,23 \pm 0,69^*$ ***	$9,29 \pm 0,78^*$ ***	$4,0 \pm 0,41^*$ **	$-0,48 \pm 2,74$
REGN7544		$7,39 \pm 0,67^*$ ***	$4,00 \pm 0,39^*$ ***	$5,82 \pm 0,51^*$ ***	$3,39 \pm 0,37$ *	$-1,43 \pm 2,74$
REGN7548		$6,81 \pm 0,76^*$	$3,91 \pm 0,84^*$	$5,36 \pm 0,68^*$	$2,93 \pm 0,68$	$-9,06 \pm 1,90$

						*
REGN7548		4,79±0,34	3,47±0,31* ***	3,92±0,30* **	1,36±0,19 *	- 19,30±1,86* *
H4H22034N	25	10,53±0,4 3****	5,38±0,42* ***	7,78±0,42* ***	5,17±0,15 **	-29,57±2,31
REGN7541		12,05±0,3 2****	9,36±0,44* ***	10,29±0,35 ****	2,73±0,23	-31,24±1,97
REGN7544		14,20±0,4 2****	4,94±0,36* ***	9,43±0,37* ***	9,30±0,14 ****	- 41,43±2,15* *
REGN7548		10,58±0,2 9****	4,71±0,25* ***	7,52±0,26* ***	5,89±0,10 ****	-35,53±1,75

Мышей $NPR1^{hu/mi}$ с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным проводили однократную подкожную инъекцию 1 или 25 мг/кг антагонистического анти-NPR1 mAb, mAb контрольного изотипа или PBS, как показано в таблице 28. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, $n=4-5$ на группу. Статистика - двусторонний дисперсионный анализ с критерием Даннета; * $p<0,05$ по сравнению с PBS

[0248] Длительные эффекты этих антагонистических анти-NPR1 антител оценивали в течение 27 суток (таблица 30, фиг. 6 и фиг. 7). После однократной подкожной инъекции 1 мг/кг на сутки 0 системное артериальное давление оставалось достоверно повышенным для 3 из 4 mAb, блокирующих NPR1, оцененных в течение периода тестирования (таблица 30 и фиг. 6). Величина повышения кровяного давления после однократного подкожного введения дозы 1 мг/кг, оцененная по среднему изменению (через 15-27 суток после введения) систолического артериального давления по сравнению с исходным уровнем, колебалась от +4,04±0,30 (H4H22034) до +9,03±0,32 (REGN7541) мм рт.ст. После однократной подкожной инъекции 25 мг/кг на сутки 0 системное артериальное давление оставалось достоверно повышенным для всех тестируемых mAb, блокирующих NPR1. Величина повышения артериального давления после однократного подкожного введения дозы 25 мг/кг, оцененная по среднему изменению (через 15-27 суток после введения) систолического артериального давления по сравнению с исходным уровнем, колебалась от +10,53±0,43 (H4H22034) до +14,2±0,42 (REGN7544) мм рт.ст. Реакция со стороны частоты сердечных сокращений была различной (таблица 29 и таблица 30), при этом общие тенденции снижения частоты соответствовали наблюдаемому повышению системного артериального давления. Диастолическое, среднее артериальное и пульсовое давление (таблица 29 и таблица 30) также достоверно изменялись после введения mAb, блокирующих

NPR1, при этом величина и продолжительность эффекта соответствовали наблюдаемым и зарегистрированным для систолического артериального давления.

[0249] Антагонистические анти-NPR1 антитела H4H22034N, REGN7541, REGN7544 и REGN7548 достоверно повышали системное артериальное давление в течение до 27 суток после однократной подкожной инъекции мышам NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением.

Пример 10: характеристика влияния на системное артериальное давление сверхэкспрессии ANP посредством гидродинамической доставки ДНК и способности реверсировать эффекты после однократной дозы 25 мг/кг антагонистического анти-NPR1 mAb у мышей NPR1^{hu/hu} с гипотензией

Экспериментальная процедура

[0250] Целью данного исследования была оценка эффектов антагонистических анти-NPR1 антител и их способности реверсировать эффекты снижения кровяного давления при сверхэкспрессии ANP у мышей NPR1^{hu/hu} с гипотензией, находящихся под телеметрическим контролем. Мышам-самцам NPR1^{hu/hu} (n=48) в возрасте ~12-16 недель имплантировали телеметры PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) и давали возможность восстановиться в течение по меньшей мере 7 суток. Животных разделяли на группы (группы 1-6) в зависимости от массы тела (таблица 31). Животных содержали индивидуально в стандартных условиях (температура от 64°F до 84°F (от 18°C до 29°C); относительная влажность от 30% до 70%) и поддерживали режим 12-ч свет/12-ч темнота. Корм (стандартный корм в виде гранул Research Diets) и воду давали вволю.

Таблица 31

Обобщенная информация по дозам и группам доз

Номер группы	HDD конструкт	доза конструкта HDD (мкг ДНК, в/в)	Опытный и контрольный образцы	Уровень дозы (мг/кг/доза, в/в)	Объемная доза (мл/кг)	Число животных
						Самцы
1	Контрольная плазмида	50	mAb контрольного изотипа	25	5	8
2	плазмида ANP		H4H22034N			8
3			REGN7541			8
4			REGN7544			8
5			REGN7548			8
6						

[0251] Плазмиды HDD и тестируемые белки вводили соответствующим животным посредством однократных внутривенных инъекций на сутки 0 и сутки 7 соответственно.

Объемная доза для введения тестируемых белков основывалась на последнем измерении массы тела.

[0252] Систолическое давление, диастолическое давление, среднее артериальное давление, пульсовое давление и частоту сердечных сокращений регистрировали в течение 10 с каждую минуту в течение периода тестирования. Данные телеметрии представлены в виде средних 24-ч значений. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SEM.

Результаты

[0253] Характеристика антагонистических анти-NPR1 антител *in vivo* показала, что по сравнению с животными, которым вводили контрольный изотип IgG4P, антагонистические анти-NPR1 антитела были способны быстро и стойко нормализовать вызванное сверхэкспрессией ANP снижение системного артериального давления у мышей NPR1^{hu/hu} (таблица 32 и таблица 33). Концентрации NTproANP в сыворотке были достоверно и устойчиво повышены в течение периода тестирования (таблица 34), что указывает на эффективную сверхэкспрессию ANP. Величина повышения кровяного давления у мышей с гипотензией, вызванной ANP HDD, после однократного внутривенного введения 25 мг/кг дозы блокатора NPR1, оцененная по среднему изменению (на сутки 7-28 после введения) систолического артериального давления по сравнению с исходным уровнем, варьировалась от $-9,27 \pm 0,61$ (H4H22034N) до $+10,26 \pm 1,48$ (REGN7544) мм рт. ст. (таблица 33 и фиг. 8) относительно до введения HDD ANP.

Среднее изменение кровяного давления и частоты сердечных сокращений через 7 суток после введения HDD по сравнению с исходными значениями

Группа с HDD:	Опытный образец	Доза опытного образца (мг/кг)	Систолическое давление (мм рт.ст.)	Диастолическое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериальное давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Число сердечных сокращений (BPM)				
Контрольная плазмида	mAb	25	-2,83±0,94	-0,79±0,88	-1,75±0,84	-2,05±0,43	0,36±6,65				
ANP плазмида	контрольного изотипа		-	-	-	-	27,31±3,53 ****	14,21±1,75**** *	-21,65±2,72****	13,00±1,82**** *	29,90±11,10****
	H4H22034 N		-	-	-	-	26,27±3,57 ****	12,94±1,74**** *	-20,13±2,69****	13,23±1,86**** *	32,31±14,17****
	REGN7541		-	-	-	-	26,92±3,58 ****	13,92±1,84**** *	-20,70±2,77****	12,96±1,78**** *	21,84±10,08*
	REGN7544		-	-	-	-	28,18±3,73 ****	14,57±1,79**** *	-21,99±2,80****	13,62±2,04**** *	18,67±17,90
	REGN7548		-	-	-	-	25,40±3,12	12,65±1,44****	-19,72±2,35****	12,70±1,72****	27,46±11,94**

		****	*		*
--	--	------	---	--	---

*Мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным вводили одну дозу HDD 50 мкг контрольной плазмиды или ANP-плазмиды с последующей однократной внутривенной инъекцией 25 мг/кг антагонистического анти-NPR1 mAb или mAb контрольного изотипа, как показано в таблице 31. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, n=4-7 на группу. Статистика - двусторонний дисперсионный анализ с критерием Даннета; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной плазмидой (pHDD1) + mAb контрольного изотипа*

Таблица 33

Среднее изменение кровяного давления и частоты сердечных сокращений в период 8-28 суток после введения HDD по сравнению с исходными значениями

Группа с HDD:	Опытный образец	Доза опыт ного образ ца (мг/кг)	Систолич еское давление(мм рт.ст.)	Диастоли ческое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериал ьное давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Число сердечных сокращений (BPM)
Контрольная плазмида	mAb	25	- 0,93±0,53* ***	0,81±0,46 ****	- 0,18±0,47 ****	-1,75±0,22****	-14,04±1,86****
	контрольно го изотипа		- 30,40±0,51	- 15,68±0,4 1	- 23,77±0,4 5	-14,64±0,18	10,49±1,77
ANP плазмида	H4H22034N		- 9,27±0,61* ***	- 6,21±0,61 ****	- 7,67±0,57 ****	-3,04±0,24****	-23,86±2,40****
	REGN7541		6,02±0,85* ***	0,43±0,54 ****	3,25±0,64 ****	5,59±0,54****	-51,16±3,86****
	REGN7544		10,26±1,48 ****	2,95±0,87 ****	6,45±1,12 ****	7,32±0,72****	-65,29±5,12****

	REGN7548	1,44±0,80* ***	- 1,29±0,65 ****	0,07±0,67 ****	2,73±0,21****	-41,61±2,57****
--	----------	-------------------	------------------------	-------------------	---------------	-----------------

Мышей $NPR1^{hu/hu}$ с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным вводили одну дозу HDD 50 мкг контрольной плазмиды или ANP-плазмиды с последующей однократной внутривенной инъекцией 25 мг/кг антагонистического анти-NPR1 mAb или mAb контрольного изотипа, как показано в таблице 31. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, $n=4-7$ на группу. Статистика - двусторонний дисперсионный анализ с критерием Даннета; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной плазмидой (pHDD1) + mAb контрольного изотипа

Таблица 34

Концентрации NTproANP в сыворотке крови на сутки 14, 21 и 28

Группа с HDD:	Опытный образец	Доза опыт ного образ ца (мг/кг /кг)	Концентрация NTproANP в сыворотке (нмоль/л)		
			Сутки 14	Сутки 21	Сутки 28
Контрольная плазида	mAb контрольного изотипа	25	0,61±0,07	0,85±0,15	0,49±0,08
ANP плазида			5,21±1,00* ***	5,54±0,55* ***	5,45±0,96****
			H4H22034N	4,74±0,62* **	4,76±0,61* **

REGN7541	5,51±0,84* ***	5,26±0,85* **	4,96±0,87***
REGN7544	6,88±0,41* ***	5,58±0,77* **	6,40±0,42****
REGN7548	6,07±0,29* ***	5,44±0,88* ***	5,78±0,21****

*Мышей NPR1^{hu/hu} с нормальным давлением, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным вводили одну дозу HDD 50 мкг контрольной плазмиды или ANP-плазмиды с последующей однократной внутривенной инъекцией 25 мг/кг антагонистического анти-NPR1 mAb или mAb контрольного изотипа, как показано в таблице 31. Все значения представляют собой средние значения ± SEM, n=4-7 на группу. Статистика - двусторонний дисперсионный анализ с критерием Даннета; *p<0,05 по сравнению с контрольной плазмидой (pHDD1) + mAb контрольного изотипа*

[0254] В соответствии с достоверным и стойким снижением системного давления и вероятным снижением перегрузки левого желудочка, абсолютная и относительная масса сердца достоверно снижалась у мышей, получивших ANP HDD (фиг. 9А и 9В). Данные показатели сердца у животных, получивших mAb, блокирующее NPR1, не отличались от этих показателей у контрольных мышей с нормальным давлением, и они указывают на эффективное повышение системного и желудочкового давления.

[0255] Антагонистические анти-NPR1 антитела, H4H22034N, REGN7541, REGN7544 и REGN7548, достоверно и стойко повышали системное артериальное давление в течение периода до 28 суток у мышей NPR1^{hu/hu} с гипотензией, индуцированной HDD ANP.

Пример 11: блокада NPR1 при профилактическом и терапевтическом введении с использованием модели шока, индуцированного LPS, у мышей NPR1^{hu/hu}, находящихся под телеметрическим контролем

Экспериментальная процедура

[0256] Целью данного исследования была оценка эффектов антагонистических анти-NPR1 антител, введенных профилактически или терапевтически мышам NPR1^{hu/hu} с гипотензией в результате введения LPS. Мышам-самцам NPR1^{hu/hu} (n=58) в возрасте ~12-17 недель имплантировали телеметры PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) и давали возможность восстановиться в течение, по меньшей мере, 7 суток. Животных разделяли на группы (группы 1-6), основываясь на массе тела, систолического и пульсового давления (таблица 35). Животных содержали индивидуально в стандартных условиях (температура от 64°F до 84°F (от 18°C до 29°C); относительная влажность от 30% до 70%) и поддерживали режим 12-ч свет/12-ч темнота. Корм (стандартный корм в виде гранул Research Diets) и воду давали вволю.

Таблица 35

Обобщенная информация по дозам и группам доз

Номер группы	Число животных	Введение	Опытный или контрольный образец	Уровень дозы (мг/кг/в/в)	Объемная доза (мл/кг)
	Самцы				
1	8	Физиологический раствор	PBS	0	5
2	10	LPS (5 мг/кг, в/б)	REGN7544	25	
3	10		REGN7548		
4	10		*Профилактика* - REGN7544		
5	10		*Профилактика* - REGN7544		
6	10		*Профилактика* -		

			REGN7548		
--	--	--	----------	--	--

[0257] Животным вводили внутривенно однократную дозу 5 мг/кг LPS или PBS на сутки 0. Тестируемые белки вводили соответствующим животным путем однократной внутривенной инъекции примерно за 24 ч до или через 8 ч после введения дозы LPS. Объемная доза для каждого животного основывалась на последнем измерении массы тела.

[0258] Систолическое давление, диастолическое давление, среднее артериальное давление, пульсовое давление и частоту сердечных сокращений регистрировали в течение 10 с каждые 10 мин в течение периода тестирования. Данные телеметрии представлены в виде средних 24-ч значений. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SEM.

Результаты

[0259] Характеристика *in vivo* антагонистических анти-NPR1 антител, которые вводили профилактически или терапевтически мышам NPR1^{hu/hu} с LPS-индуцированной гипотензией, показала достоверное и стойкое повышение системного артериального давления (таблица 36, таблица 37, фиг. 10). У животных, которым вводили профилактические дозы, наблюдали быстрое повышение давления (таблица 36). Величина повышения артериального давления в группе исследования с профилактическим введением после однократного внутривенного введения дозы 25 мг/кг, оцененная по среднему изменению (за 24 ч до введения LPS) систолического артериального давления по сравнению с исходным уровнем, колебалась в пределах $+7,24 \pm 1,18$ (REGN7548) до $+9,07 \pm 1,10$ (REGN7541) мм рт. ст. (таблица 36 и фиг. 10). Величина повышения артериального давления после однократного внутривенного введения дозы 25 мг/кг через 8 ч после введения LPS, оцененная по среднему изменению (от 8 до 48 ч после введения LPS) систолического артериального давления по сравнению с исходным уровнем, колебалась в пределах $-1,49 \pm 2,244$ (REGN7548) до $-1,49 \pm 2,24$ (REGN7544) мм рт.ст. (таблица 37). Пульсовое давление у животных, которым вводили терапевтические дозы, оцениваемое по среднему изменению (от 8 ч до 48 ч после введения LPS) пульсового давления по сравнению с исходным уровнем, колебалось от $0,27 \pm 0,93$ (REGN7548) до $-0,40 \pm 0,91$ (REGN7544) мм рт. ст. (таблица 37, фиг. 10).

Таблица 36

Среднее изменение за 24 ч до времени 0 до введения дозы LPS кровяного давления и частоты сердечных сокращений по сравнению с исходными значениями

Введение	Группа с дозой	Доза (мг/кг)	Систолическое давление (мм рт.ст.)	Диастолическое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериальное давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Частота сердечных сокращений (BPM)
Физиологический раствор	PBS	0	0,14±1,2	-0,13±1,02	0,03±1,10	0,30±0,23***	1,85±8,06
LPS	PBS		-0,90±1,2	0,26±1,06	-0,37±1,15	-1,13±0,19	4,89±7,91
LPS	*Профилактически* REGN7544	25	9,07±1,10****	3,49±0,96****	6,65±0,99****	5,60±0,32****	-2,57±5,84
LPS	*Профилактически* REGN7548		7,24±1,18****	1,93±1,08	4,93±1,09****	5,30±0,24****	-2,93±5,31
LPS	REGN7544		-0,04±1,36	2,46±1,28	1,08±1,31	-2,55±0,20**	-0,57±8,27
LPS	REGN7548		-0,44±1,26	-0,49±1,11	-0,41±1,18	0,05±0,18****	2,85±8,05

Мышей $NPR1^{hu/hu}$, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным проводили однократную внутривенную инъекцию 5 мг/кг LPS или физиологического раствора и однократную внутривенную инъекцию антагонистического анти-NPR1 антитела mAb или PBS примерно за 24 ч до или через 8 ч после введения LPS,

как показано в таблице 35. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, $n=7-10$ на группу. Статистика - двусторонний дисперсионный анализ с критерием Даннета; $*p<0,05$ по сравнению с LPS+PBS.

Таблица 37

Среднее изменение в период 8-48 ч после введения дозы LPS кровяного давления и частоты сердечных сокращений по сравнению с исходными значениями

Введение	Группа дозой	Доза (мг/кг)	Систолическое давление (мм рт.ст.)	Диастолическое давление (мм рт.ст.)	Среднее артериальное давление (мм рт.ст.)	Пульсовое давление (мм рт.ст.)	Частота сердечных сокращений (BPM)
Физиологический раствор	PBS	0	0,66 \pm 0,68****	0,10 \pm 0,69****	-0,15 \pm 0,71****	0,56 \pm 0,13****	-41,12 \pm 6,54****
LPS	PBS		-7,52 \pm 1,75	-3,33 \pm 1,34	-5,77 \pm 1,48	-4,19 \pm 0,54	-10,32 \pm 5,50
LPS	*Профилактически* - REGN7544	25	-3,32 \pm 2,28**	-3,41 \pm 1,69	-3,88 \pm 1,93	0,24 \pm 0,85****	-39,73 \pm 3,84****
LPS	*Профилактически* - REGN7548		-6,13 \pm 2,19	-5,10 \pm 1,48	-5,84 \pm 1,76	-1,03 \pm 0,95****	-4,37 \pm 5,63
LPS	REGN7544		-1,49 \pm 2,46****	-1,92 \pm 1,71	-1,57 \pm 2,03***	-0,40 \pm 0,91****	-66,59 \pm 9,70****
LPS	REGN7548		-1,49 \pm 2,24****	-1,50 \pm 1,60	-1,63 \pm 1,85**	0,27 \pm 0,93****	-69,46 \pm 8,02****

Мышей $NPR1^{hu/hu}$, находящихся под телеметрическим контролем, рандомизировали на группы в зависимости от массы тела. Животным

*проводили однократную внутривенную инъекцию 5 мг/кг LPS или физиологического раствора и однократную внутривенную инъекцию антагонистического анти-NPR1 антитела mAb или PBS примерно за 24 ч до или через 8 ч после введения LPS, как показано в таблице 35. Все значения представляют собой средние значения \pm SEM, n=7-10 на группу. Статистика - двусторонний дисперсионный анализ с критерием Даннета; * $p < 0,05$ по сравнению с LPS+PBS.*

[0260] Антагонистические анти-NPR1 антитела REGN7544 и REGN7548 достоверно и стойко повышали системное артериальное давление при профилактическом или терапевтическом введении мышам с LPS-индуцированной гипотензией после однократного внутривентрального введения LPS.

Пример 12: каждый мономер NPR1 связывает один Fab REGN7544

Экспериментальная процедура

Образование комплекса NPR1+REGN7544 Fab+ANP

[0261] Внеклеточный домен NPR1 человека с С-концевой меткой мус-мус-6×His (hNPR1-mmh; SEQ ID NO: 74) смешивали с предсердным натрийуретическим пептидом (ANP, Tocris) и REGN7544 Fab в молярном соотношении 1 hNPR1-mmh+2 ANP+1 REGN7544 Fab. Комплекс инкубировали в течение ночи при 4°C, затем очищали на колонке Superdex 200 increase 10/300 GL для эксклюзионной хроматографии, уравновешенной 50 mM Трис, pH 7,5, 150 mM NaCl. Пиковые фракции собирали, концентрировали и концентрировали с использованием центрифужного концентратора MWCO 10 кДа (Amicon).

Приготовление сетки для крио-ЭМ и сбор данных

[0262] Комплекс NPR1-ANP-REGN7544 разбавляли до 0,87 мг/мл и добавляли (поли(малеиновый ангидрид-alt-1-децен), замещенный 3-(диметиламино)пропиламином) (PMAL-C8; Anatrace, номер по каталогу #P5008), до 0,15% конечной концентрации. Образец наносили на свежеччищенную плазмой сетку UltrAufoil (Quantifoil GmbH). Избыток раствора удаляли промоканием фильтровальной бумагой и погружали в жидкий этан, используя Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Part #1086439). Сетки загружали на электронный просвечивающий микроскоп Titan Krios G3i (Thermo Fisher Part #1137337), оснащенный энергетическим фильтром Bioquantum+детектором прямых электронов K3 (Gatan Inc, Part #1147213). Кадры собирали с использованием EPU v 2.7 (Thermo Fisher) при 105000× увеличении, что соответствует размеру пикселя 0,86 Å. Использовали мощность дозы 15 электронов на пиксель в секунду, и каждый кадр продолжался 2 с и 46 кадров, что соответствует общей дозе ~ 40 электронов на Å².

Обработка данных крио-ЭМ

[0263] Всю обработку данных крио-ЭМ осуществляли с использованием cryoSPARC v3.2.0 (Structura Biotechnology Inc.). Кадры выравнивали с использованием коррекции движения и оценки STF. Всего было собрано 6692 кадров, и затем после коррекции движения и STF отобрали 6474 кадров. Первоначальный набор частиц, собранных с использованием устройства для сбора, подвергали 2D-классификации для создания матриц для сбора матриц. Примерно 1,6 млн частиц, собранных с сбором матриц, подвергали многочисленным раундам 2D-классификации, в результате чего было получено 814655 «хороших» сложных частиц. Ab initio реконструкция с 6 классами с последующим гетерогенным уточнением приводила к получению одного «хорошего» класса, содержащего 310944 частицы, что соответствовало полному Fab NPR1-ANP-REGN7544 на изотропной карте. Неравномерное уточнение частиц в «хорошем» классе с последующим

локальным уточнением давали карту с разрешением 3,15 Å (FSC=0,143), которую использовали для построения модели. На эту карту вручную помещали модели NPR1 (взятые из кода PDB 1T34) и двух Fab (взятых из структур предыдущего антитела Regeneron). Затем эти модели вручную перестраивали с использованием Coot (v 0.8.2 Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology) и уточняли в реальном пространстве по карте с помощью Phenix (версия 1.15.2 The PHENIX Industrial Consortium).

Образование комплекса NPR1+REGN7544 Fab

[0264] Внеклеточный домен NPR1 человека с С-концевой меткой мус-мус-6×His (hNPR1-mmh; SEQ ID NO: 74) смешивали с REGN7544 Fab в молярном соотношении 1 hNPR1-mmh+1 REGN7544 Fab. Комплекс инкубировали в течение ночи при 4°C, затем очищали на колонке Superdex 200 increase 10/300 GL 1 для эксклюзионной хроматографии, уравновешенной 50 mM Трис, pH 7,5, 150 mM NaCl. Пиковые фракции собирали, концентрировали и концентрировали с использованием центрифужного концентратора MWCO 10 кДа (Amicon).

Приготовление сетки для крио-ЭМ и сбор данных

[0265] Комплекс NPR1-REGN7544 разбавляли до 0,8 мг/мл и добавляли (поли(малеиновый ангидрид-alt-1-децен), замещенный 3-(диметиламино)пропиламином) (PMAL-C8; Anatrace, номер по каталогу #P5008), до 0,15% конечной концентрации. Образец наносили на свежеччищенную плазмой сетку UltraAufoil (Quantifoil GmbH). Избыток раствора удаляли промоканием фильтровальной бумагой и погружали в жидкий этан, используя Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Part #1086439). Сетку загружали на электронный просвечивающий микроскоп Titan Krios G3i (Thermo Fisher Part #1137337), оснащенный энергетическим фильтром Bioquantum+детектором прямых электронов K3 (Gatan Inc, Part #1147213). Кадры собирали с использованием EPU v 2.7 (Thermo Fisher) при 105000× увеличении, что соответствует размеру пикселя 0,86 Å. Использовали мощность дозы 15 электронов на пиксель в секунду, и каждый кадр продолжался 2 с и 46 кадров, что соответствует общей дозе ~ 40 электронов на Å².

Обработка данных крио-ЭМ

[0266] Всю обработку данных крио-ЭМ осуществляли с использованием cryoSPARC v3.2.0 (Structura Biotechnology Inc.). Кадры выравнивали с использованием коррекции движения и оценки CTF. Всего было собрано 10378 кадров, и затем после коррекции движения и CTF отобрали 9660 кадров. Первоначальный набор частиц, собранных с использованием устройства для сбора, подвергали 2D-классификации для создания матриц для сбора матриц. Примерно 1,7 млн частиц, собранных с сбором матриц, подвергали многочисленным раундам 2D-классификации, в результате чего было получено 762681 «хороших» сложных частиц. Ab initio реконструкция с 6 классами с последующим гетерогенным уточнением приводила к получению одного «хорошего» класса, содержащего 256375 частиц, что соответствовало полному Fab NPR1-ANP-REGN7544 на изотропной карте. Неравномерное уточнение частиц в «хорошем» классе с последующим локальным уточнением давали карту с разрешением 3,42 Å (FSC=0,143), которую

использовали для построения модели. На эту карту вручную помещали модели NPR1 (взяты из кода PDB 1DP4) и двух Fab (взяты из структур предыдущего антитела Regeneron). Затем эти модели вручную перестраивали с использованием Coot (v 0.8.2 Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology) и уточняли в реальном пространстве по карте с помощью Phenix (версия 1.15.2 The PHENIX Industrial Consortium).

Результаты

[0267] Структуры hNPR1+ANP+REGN7544 Fab и hNPR1+REGN7544 Fab показали, что каждый мономер NPR1 связывает один REGN7544 Fab. Fab связывается с остатками в нижней доле внеклеточного домена (C-концевой, ближе к клеточной мембране). При связывании REGN7544 димер NPR1 принимает неактивную конформацию в отсутствие ANP и активную конформацию в присутствии ANP. Эти конформации очень похожи на наблюдаемые состояния NPR1 без связанного антитела в присутствии или в отсутствие ANP; однако эти исследования были проведены с растворимыми внеклеточными доменами, а не с полной мембраносвязанной формой NPR1. Как тяжелая, так и легкая цепи REGN7544 взаимодействуют с внеклеточным доменом NPR1. Контактные остатки во внеклеточном домене NPR1 остаются неизменными как в присутствии, так и в отсутствие ANP. В тяжелой цепи имеется 15 контактных остатков, и в легкой цепи - 7 контактных остатков. Остатки во внеклеточном домене NPR1, непосредственно взаимодействующие с Fab REGN7544, представляют собой Arg143, Leu144, Glu384, Leu401, Val402, Ala103, Ser405, Gly406, Arg407, Lys408, Trp411, Leu413, Gly414, Tyr415 и Pro416.

Пример 13: оценка способности сосудорасширяющих агентов реверсировать REGN7544-индуцированные изменения кровяного давления

[0268] Способность трех различных сосудорасширяющих агентов (нифедипин (Sigma-Aldrich), эналаприл (Sigma-Aldrich) и молсидомин (Sigma-Aldrich)) с разными механистическими мишенями реверсировать REGN7544-индуцированное повышение кровяного давления оценивали на мышах с гуманизированным NPR1. Эналаприл, молсидомин и нифедипин, три использованных сосудорасширяющих препарата, вводили перорально. Эналаприл снижает кровяное давление за счет ингибирования ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), который снижает кровяное давление за счет уменьшения выработки ангиотензина II, вазоконстриктора, и повышения уровня брадикинина, пептида, который увеличивает диаметр кровеносных сосудов. Молсидомин, донор оксида азота, и нифедипин, блокатор кальциевых каналов, также снижают кровяное давление.

[0269] Схема дозирования для оценки реверсирования REGN7544-индуцированных эффектов сосудорасширяющих препаратов, у мышей с гуманизированным NPR1, находящихся под телеметрическим контролем, обобщена в следующей таблице:

Таблица 38

Группы с дозами				Использованные мыши		Продолжительность исследования
Введение на сутки 0		Ежедневное введение в период 7-13 суток		n	Возраст (недели)	
Опытный образец	Вводимая доза (п/к)	Опытный образец	Вводимая доза (перорально)			
PBS	5 мл/кг	Вода	10 мл/кг	6	13-15	13 суток
REGN7544 4	25 мг/кг	Вода	10 мл/кг	6		
		Нифедипин	20 мг/кг	6		
		Энаприл	25 мг/кг	7		
		Молсидомин	10 мг/кг	7		

PBS, забуференный фосфатом физиологический раствор; SC, подкожно

[0270] Мышам самцам с гуманизированным NPR1 в возрасте 13-15 недель, находящихся под телеметрическим контролем, вводили однократную дозу 25 мг/кг REGN7544 (n=28) или контрольный носитель (т.е. PBS) (n=7) посредством подкожной (SC) инъекции на сутки 0. Начиная с суток 7 (через 169 ч после подкожного введения), мышам, предварительно обработанным REGN7544, начали вводить перорально (PO) ежедневные дозы нифедипина (20 мг/кг), эналаприла (25 мг/кг), молсидомина (10 мг/кг) или воды (n=7/группа), в то время как все мыши, предварительно обработанные контрольным носителем, получали воду. Диастолическое и систолическое артериальное давление регистрировали для всех животных непрерывно за 72 ч до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента, и эти измерения использовали для расчета пульсового давления. Среднее изменение пульсового давления, нормализованного к исходному уровню, для каждой группы обработки измеряли i) между 149 и 221 ч после введения REGN7544 или контрольного носителя и ii) за 3 суток до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента.

[0271] Каждый сосудорасширяющий препарат демонстрировал снижение пульсового давления (PP) у мышей с гуманизированным NPR1, предварительно обработанных REGN7544 (фиг. 11). Действительно, было показано, что введение вазодилататоров реверсирует эффекты REGN7544, повышающие пульсовое давление.

[0272] Мышам самцам с гуманизированным NPR1 в возрасте 13-15 недель, находящихся под телеметрическим контролем, вводили однократную дозу 25 мг/кг REGN7544 (n=28) или контрольный носитель (т.е. PBS) (n=7) посредством подкожной (SC) инъекции на сутки 0. Начиная с суток 7, мышам, предварительно обработанным REGN7544, начали вводить перорально (PO) ежедневные дозы нифедипина (20 мг/кг), эналаприла (25

мг/кг), молсидомина (10 мг/кг) или воды (n=7/группу), в то время как все мыши, предварительно обработанные контрольным наполнителем, получали воду. Пульсовое давление регистрировали для всех животных непрерывно за 72 ч до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента. Среднее изменение систолического артериального давления, нормализованного к исходному уровню, для каждой группы обработки измеряли за 3 суток до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента.

[0273] Сосудорасширяющие препараты снижали систолическое артериальное давление (SBP) у мышей с гуманизированным NPR1, предварительно обработанных REGN7544 (фиг. 12). Действительно, было установлено, что введение вазодилаторов реверсирует REGN7544-индуцированное повышение систолического артериального давления.

[0274] Мышам самцам с гуманизированным NPR1 в возрасте 13-15 недель, находящихся под телеметрическим контролем, вводили однократную дозу 25 мг/кг REGN7544 (n=28) или контрольный носитель (т.е. PBS) (n=7) посредством подкожной (SC) инъекции на сутки 0. Начиная с суток 7, мышам, предварительно обработанным REGN7544, начали вводить перорально (PO) ежедневные дозы нифедипина (20 мг/кг), эналаприла (25 мг/кг), молсидомина (10 мг/кг) или воды (n=7/группа), в то время как все мыши, предварительно обработанные контрольным наполнителем, получали воду. Пульсовое давление регистрировали у всех животных непрерывно за 72 ч до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента. Среднее изменение частоты сердечных сокращений, нормализованное к исходному уровню, для каждой группы обработки измеряли за 3 суток до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента.

[0275] Не регистрировали наблюдаемого эффекта на частоту сердечных сокращений после введения эналаприла, молсидомина и нифедипина (данные не приведены). Действительно, было показано, что введение вазодилаторов в присутствии REGN7544 не оказывало влияния на частоту сердечных сокращений.

[0276] Мышам самцам с гуманизированным NPR1 в возрасте 13-15 недель, находящихся под телеметрическим контролем, вводили однократную дозу 25 мг/кг REGN7544 (n=28) или контрольный носитель (т.е. PBS) (n=7) посредством подкожной (SC) инъекции на сутки 0. Начиная с суток 7, мышам, предварительно обработанным REGN7544, начали вводить перорально (PO) ежедневные дозы нифедипина (20 мг/кг), эналаприла (25 мг/кг), молсидомина (10 мг/кг) или воды (n=7/группу), в то время как все мыши, предварительно обработанные контрольным наполнителем, получали воду. Систолическое и диастолическое артериальное давление регистрировали для всех животных непрерывно в течение 72 ч до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента, и эти измерения использовали для расчета пульсового давления. Среднее пульсовое давление для каждой группы обработки измеряли за 3 суток до введения REGN7544 или контрольного носителя и до конца эксперимента. Введение вазодилаторов устраняло

эффект повышения пульсового давления при однократном подкожном введении REGN7544 (данные не приведены).

[0277] Мышам самцам с гуманизированным NPR1 в возрасте 13-15 недель, находящихся под телеметрическим контролем, вводили однократную дозу 25 мг/кг REGN7544 (n=28) или контрольный носитель (т.е. PBS) (n=7) посредством подкожной (SC) инъекции на сутки 0. Начиная с суток 7, мышам, предварительно обработанным REGN7544, начали вводить перорально (PO) ежедневные дозы нифедипина (20 мг/кг), эналаприла (25 мг/кг), молсидомина (10 мг/кг) или воды (n=7/группу), в то время как все мыши, предварительно обработанные контрольным наполнителем, получали воду. Систолическое артериальное давление регистрировали для всех животных непрерывно за 72 ч до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента. Среднее систолическое артериальное давление для каждой группы лечения измеряли за 3 дня до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента. Введение вазодилаторов устраняло эффект повышения систолического артериального давления при однократном подкожном приеме REGN7544 (данные не приведены).

[0278] Мышам самцам с гуманизированным NPR1 в возрасте 13-15 недель, находящихся под телеметрическим контролем, вводили однократную дозу 25 мг/кг REGN7544 (n=28) или контрольный носитель (т.е. PBS) (n=7) посредством подкожной (SC) инъекции на сутки 0. Начиная с суток 7, мышам, предварительно обработанным REGN7544, начали вводить перорально (PO) ежедневные дозы нифедипина (20 мг/кг), эналаприла (25 мг/кг), молсидомина (10 мг/кг) или воды (n=7/группу), в то время как все мыши, предварительно обработанные контрольным наполнителем, получали воду. Частоту сердечных сокращений регистрировали у всех животных непрерывно за 72 ч до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента. Среднюю частоту сердечных сокращений для каждой группы обработки измеряли за 3 суток до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента. Введение вазодилаторов после однократного приема REGN7544 не оказало компенсаторного эффекта на частоту сердечных сокращений (данные не приведены).

[0279] Мышам самцам с гуманизированным NPR1 в возрасте 13-15 недель, находящихся под телеметрическим контролем, вводили однократную дозу 25 мг/кг REGN7544 (n=28) или контрольный носитель (т.е. PBS) (n=7) посредством подкожной (SC) инъекции на сутки 0. Начиная с суток 7, мышам, предварительно обработанным REGN7544, начали вводить перорально (PO) ежедневные дозы нифедипина (20 мг/кг), эналаприла (25 мг/кг), молсидомина (10 мг/кг) или воды (n=7/группа), в то время как все мыши, предварительно обработанные контрольным наполнителем, получали воду. Диастолическое артериальное давление регистрировали для всех животных непрерывно за 72 ч до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента. Среднее диастолическое артериальное давление (i), нормализованное к исходному уровню и (ii) ненормализованное для каждой группы обработки, измеряли за 3 суток до введения REGN7544 или контрольного носителя до конца эксперимента. Введение эналаприла

устраняло эффект повышения диастолического артериального давления при однократном подкожном введении REGN7544 (данные не показаны).

[0280] Таким образом, обратимость гемодинамических эффектов после подкожного введения 25 мг/кг REGN7544 тестировали при пероральном введении через зонд 3 клинических сосудорасширяющих препаратов. Каждый из трех различных сосудорасширяющих препаратов, нифедипин, эналаприл и молсидомин, реверсировал REGN7544-индуцированное повышение PP, не оказывая при этом заметного значимого влияния на частоту сердечных сокращений. Повышение PP, опосредованное REGN7544, по отдельности реверсировалось любым из трех клинических вазодилататоров (нифедипином, эналаприлом и молсидомином), которые вводили перорально.

[0281] Настоящее изобретение не должно ограничиваться объемом конкретных вариантов осуществления, описанных в настоящем документе. Действительно, из вышеприведенного описания и сопроводительных фигур специалистам в данной области техники станут очевидными различные модификации изобретения в дополнение к описанным здесь. Полагается, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком рецептора натрийуретического пептида 1 (NPR1), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с NPR1 и блокируют NPR1.

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

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп.1 или 2, где антитело обладает одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из: (a) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело; (b) связывается с NPR1 человека при 25°C и при 37°C с константой диссоциации (K_D) ниже 1,7 нМ, как определено анализом поверхностного плазмонного резонанса; (c) связывается с NPR1 обезьяны при 25°C и 37°C с K_D ниже 1,99 нМ, как определено анализом поверхностного плазмонного резонанса; (d) связывается с NPR1 человека в присутствии ANP при 25°C и при 37°C с K_D ниже 1,52 нМ, как определено анализом поверхностного плазмонного резонанса; (e) ингибирует индуцированную лигандом активацию NPR1, как определено анализом накопления cGMP; (f) связывается с NPR1 человека в присутствии или в отсутствии ANP или BNP с EC_{50} ниже 2,9 нМ, как определено иммуноанализом на основе электрохемилюминесценции; (g) связывается с NPR1 обезьяны в присутствии или в отсутствии ANP или BNP с EC_{50} ниже 4,2 нМ, как определено иммуноанализом на основе электрохемилюминесценции; (h) повышает системное артериальное давление при введении мышам с нормальным давлением и гипотензией, где повышение системного артериального давления сохраняется примерно до 28 суток после введения однократной дозы; (i) повышает системное артериальное давление при введении мышам с гипотензией, индуцированной сверхэкспрессией ANP, где повышение системного артериального давления сохраняется примерно до 28 суток после введения однократной дозы; и (j) повышает системное артериальное давление у мышей с гипотензией, индуцированной LPS.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три участка, определяющих комплементарность (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в переменной области тяжелой цепи (HCVR); и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в переменной области легкой цепи (LCVR), где:

HCVR содержит:

(i) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 38 и 55;

(ii) аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 38 и 55;

(iii) аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 38 и 55; или

(iv) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 38 и 55, где указанная аминокислотная последовательность имеет не более 12 аминокислотных замен,

и LCVR содержит:

(a) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 46 и 63;

(b) аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 46 и 63;

(c) аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 46 и 63; или

(d) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 46 и 63, где указанная аминокислотная последовательность имеет не более 10 аминокислотных замен.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 38 и 55.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, содержащие вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 46 и 63.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, содержащие три участка, определяющих комплементарность (CDR), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 38 и 55; и три CDR, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 46 и 63.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, содержащие пару аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR)/вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 38/46 и 55/63.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, содержащие:

(a) участок, определяющий комплементарность тяжелой цепи (HCDR)1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 40 и 57;

(b) участок HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 42 и 59;

(c) участок HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 28, 44 и 61;

(d) участок, определяющий комплементарность легкой цепи (LCDR)1, имеющий

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 48 и 65;

(е) участок LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AAS и GAS; и

(f) участок LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32 и 69.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, содержащие участки, определяющие комплементарность (CDR), выбранные из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO: 12, AAS и SEQ ID NO: 16; (b) SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 12, AAS и SEQ ID NO: 32; (c) SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 48, AAS и SEQ ID NO: 16; и (d) SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, GAS и SEQ ID NO: 69.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, содержащие пару аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR)/вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 38/46 и 55/63.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 34, 51 и 71.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где легкая цепь выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 36, 53 и 73.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 34, 51 и 71; и легкая цепь выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 36, 53 и 73.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с остатками в нижней доле внеклеточного домена NPR1.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют, по меньшей мере, с одним из остатков NPR1, выбранных из группы, состоящей из Arg143, Leu144, Glu384, Leu401, Val402, Ala103, Ser405, Gly406, Arg407, Lys408, Trp411, Leu413, Gly414, Tyr415 и Pro416.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16,

содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71; и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с белком рецептора натрийуретического пептида 1 (NPR1) с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-20.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

24. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует переменную область тяжелой цепи (HCVR) антитела по любому из пп.1-20.

25. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует переменную область легкой цепи (LCVR) антитела по любому из пп.1-20.

26. Вектор, содержащий полинуклеотидную молекулу по п.24.

27. Вектор, содержащий полинуклеотидную молекулу по п.25.

28. Клетка-хозяин, экспрессирующая вектор по пп.26 и/или 27.

29. Способ получения анти-NPR1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п.28 в условиях, обеспечивающих продукцию антитела или его фрагмента, и выделение продуцированного таким образом антитела или фрагмента.

30. Способ по п.29, дополнительно включающий формуляцию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в виде фармацевтической композиции, содержащей приемлемый носитель.

31. Способ лечения, профилактики или облегчения, по меньшей мере, одного симптома или признака NPR1-ассоциированного заболевания или расстройства, где способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-20 субъекту, нуждающемуся в этом.

32. Способ по п.31, где NPR1-ассоциированное заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из гипотензии, циркуляторного шока, септического шока, нейрогенной ортостатической гипотензии, синдрома постуральной ортостатической тахикардии (POTS), сердечной недостаточности, кардиогенного шока, ожирения, почечной недостаточности, хронического заболевания почек, макулярного отека, глаукомы, инсульта, заболевания легких, фиброза легких, воспаления, астмы, нарушения роста скелета, переломов костей, диабета, гипогликемии и рака.

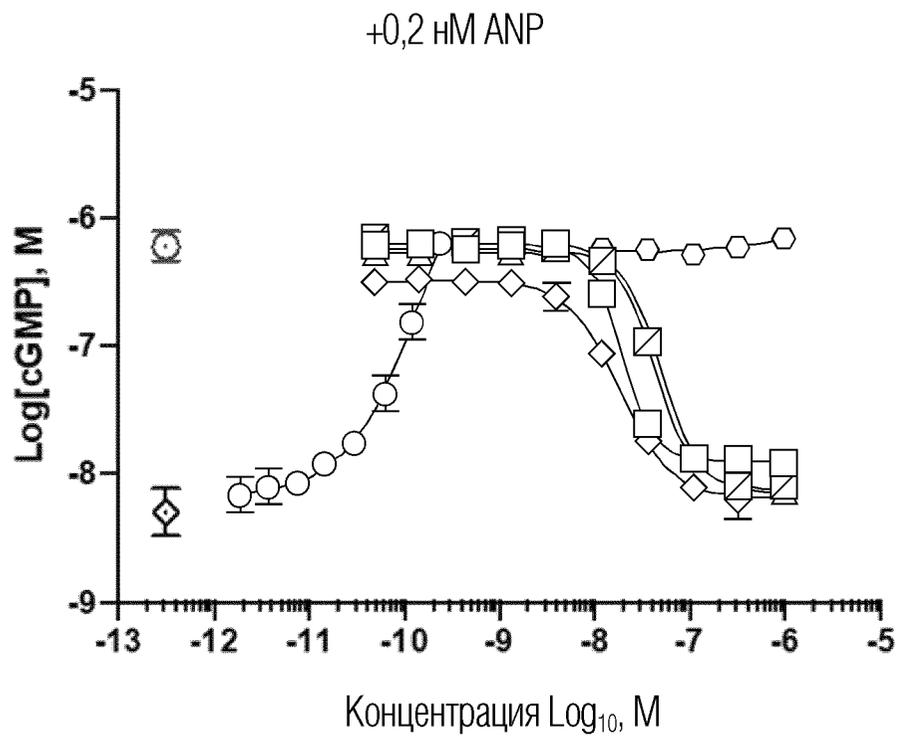
33. Способ по пп.31 или 32, где фармацевтическую композицию вводят профилактически или терапевтически субъекту, нуждающемуся в этом.

34. Способ по любому из пп.31-33, где фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом или способом лечения.

35. Способ по п.34, где второй терапевтический агент или способ лечения выбран из группы, состоящей из ингибитора ангиогенеза, вазоконстриктора/вазопрессора, иммунодепрессанта, аскорбиновой кислоты, ингибитора кальциневрина, кортикостероида, ингибитора VEGF, противоотечного средства, антидепрессанта, гормонального контроля рождаемости, стимулятора (включая сердечный стимулятор), кофеина, экстракорпоральной мембранной оксигенации, желудочкового вспомогательного устройства, внутриортального баллонного насоса, изменения образа жизни, пищевой добавки, противомикробного препарата, инсулина и противовоспалительного препарата.

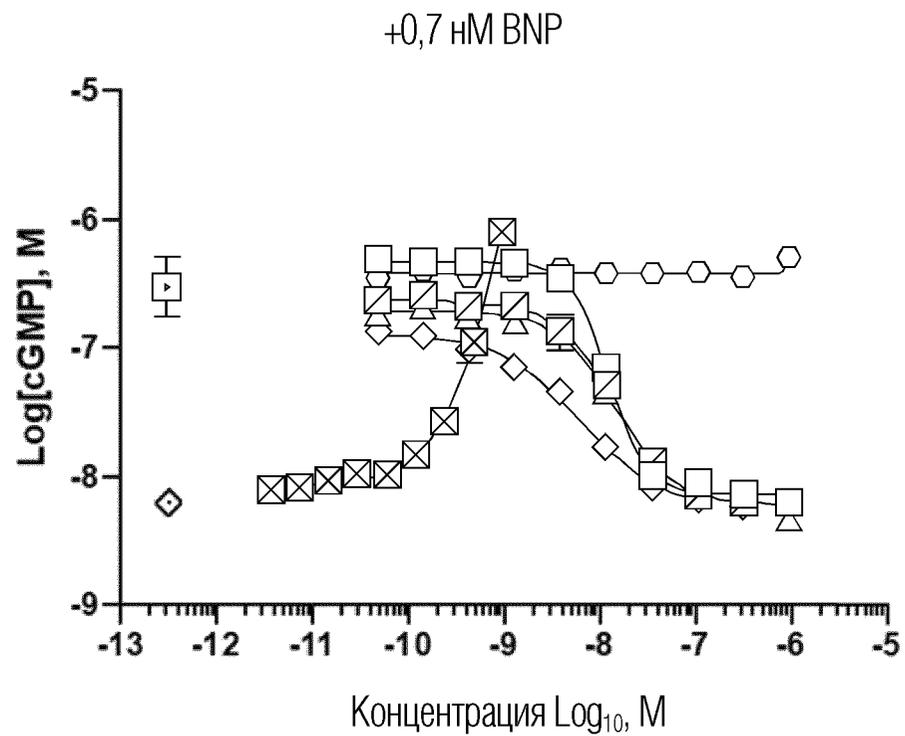
36. Способ по любому из пп.31-35, где фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутривожно, внутривнутрино или внутримышечно.

По доверенности

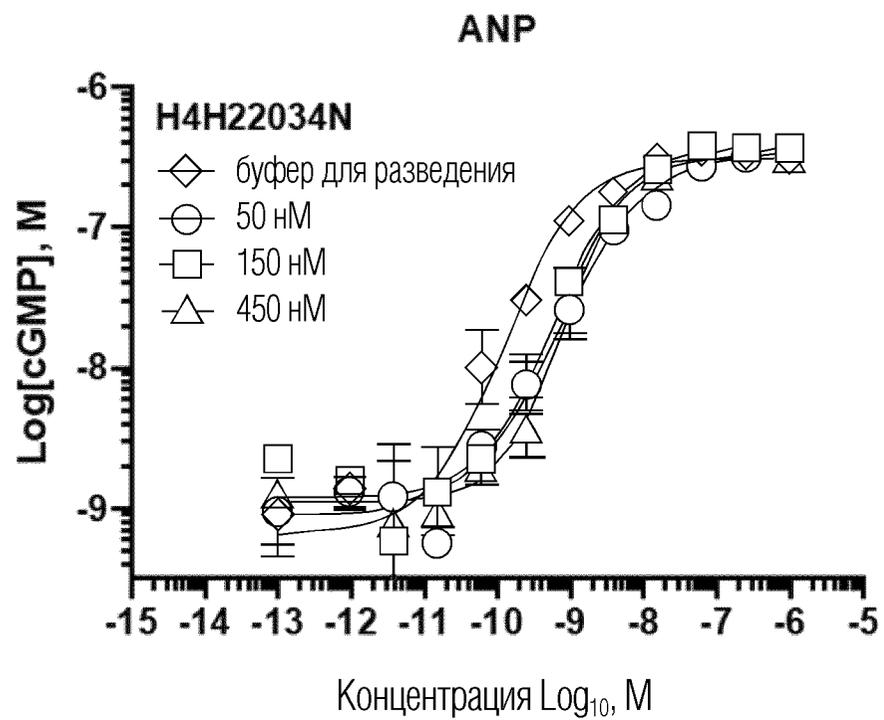


ФИГ. 1А

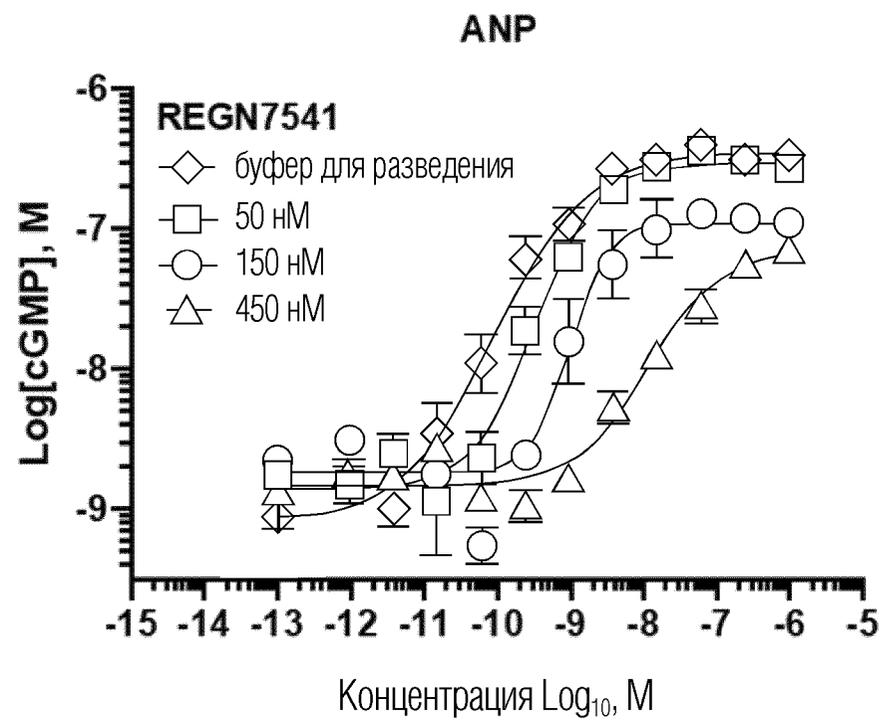
- ANP
- ⊠ BNP
- H4H22034N
- ⊞ REGN7541
- △ REGN7544
- ◇ REGN7548
- ⊕ Control mAb
- ⊙ 0,2 нМ ANP
- ⊞ 0,7 нМ BNP
- ◇ буфер для разведения



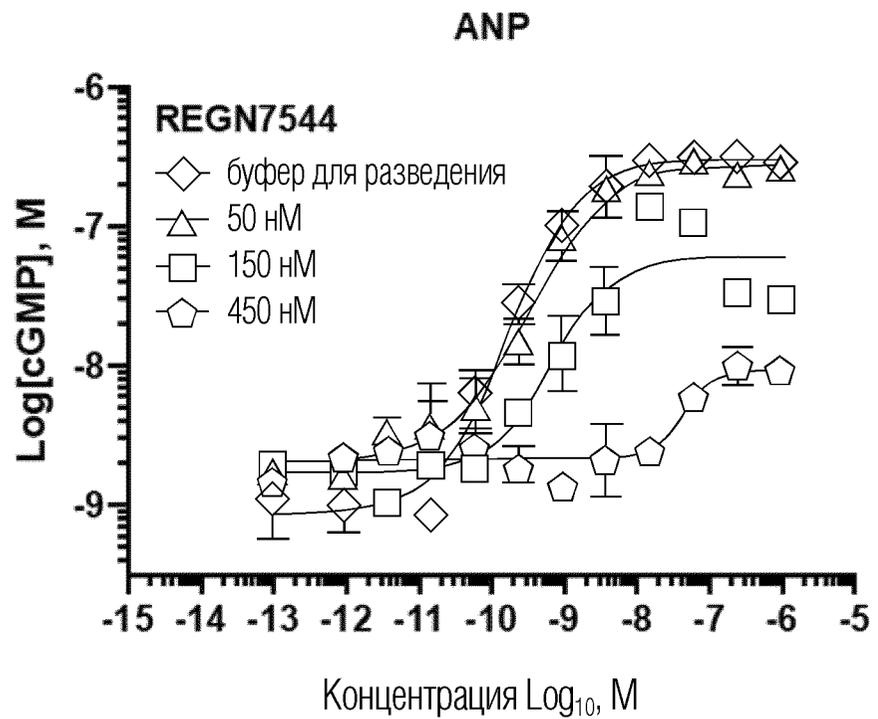
ФИГ. 1В



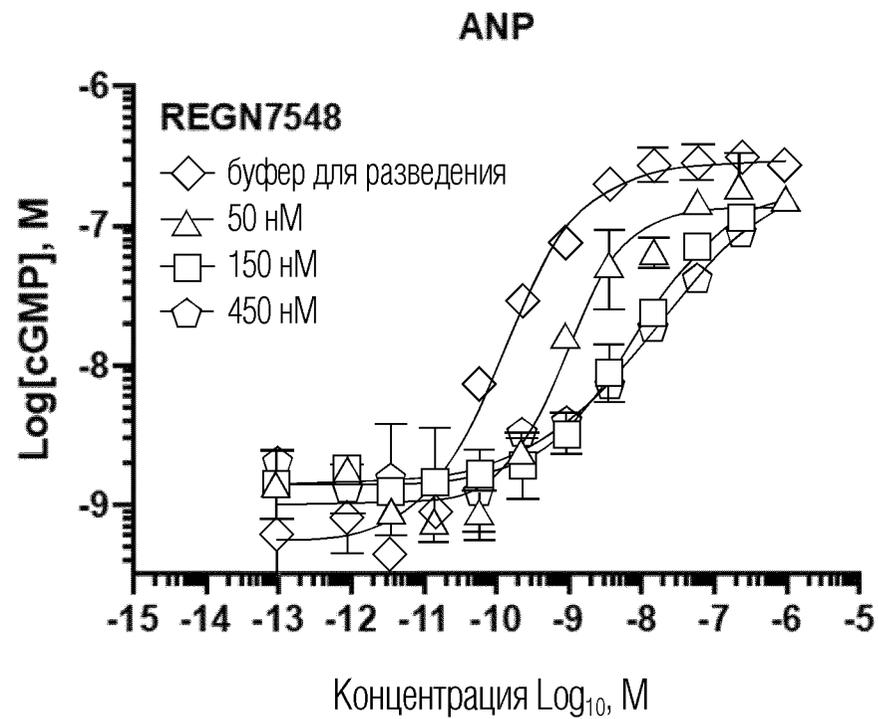
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

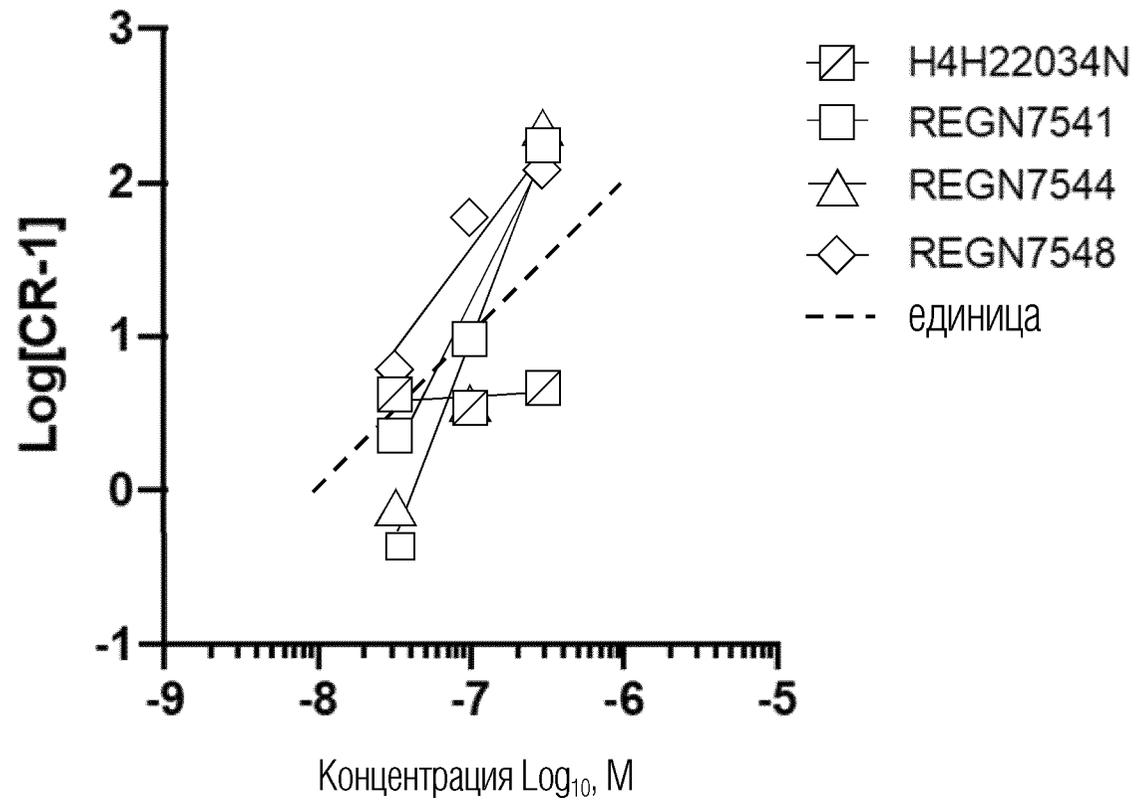


ФИГ. 2С

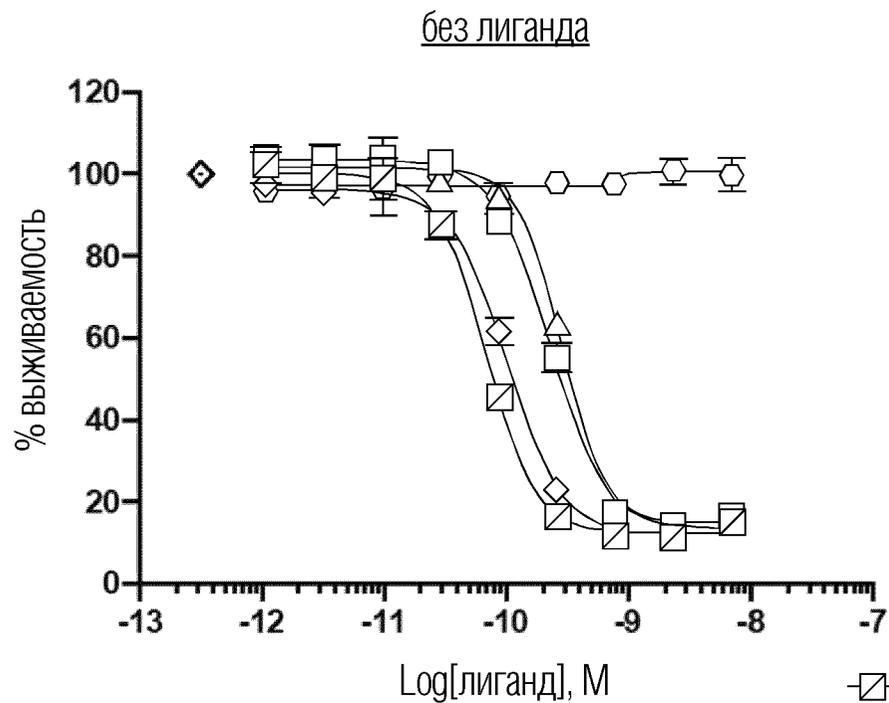


ФИГ. 2D

График Шильда

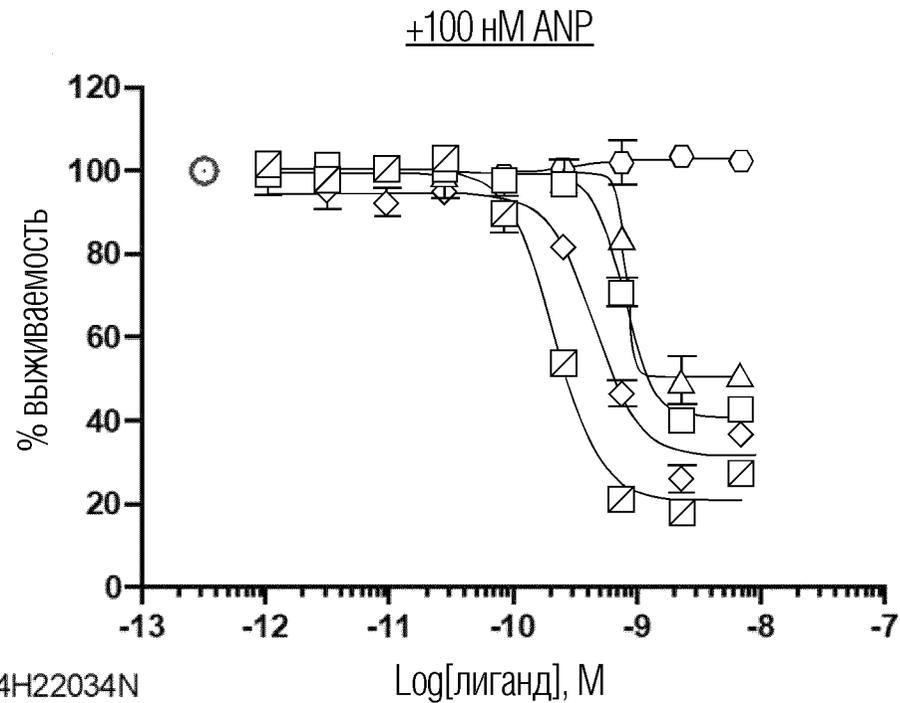


ФИГ. 2Е

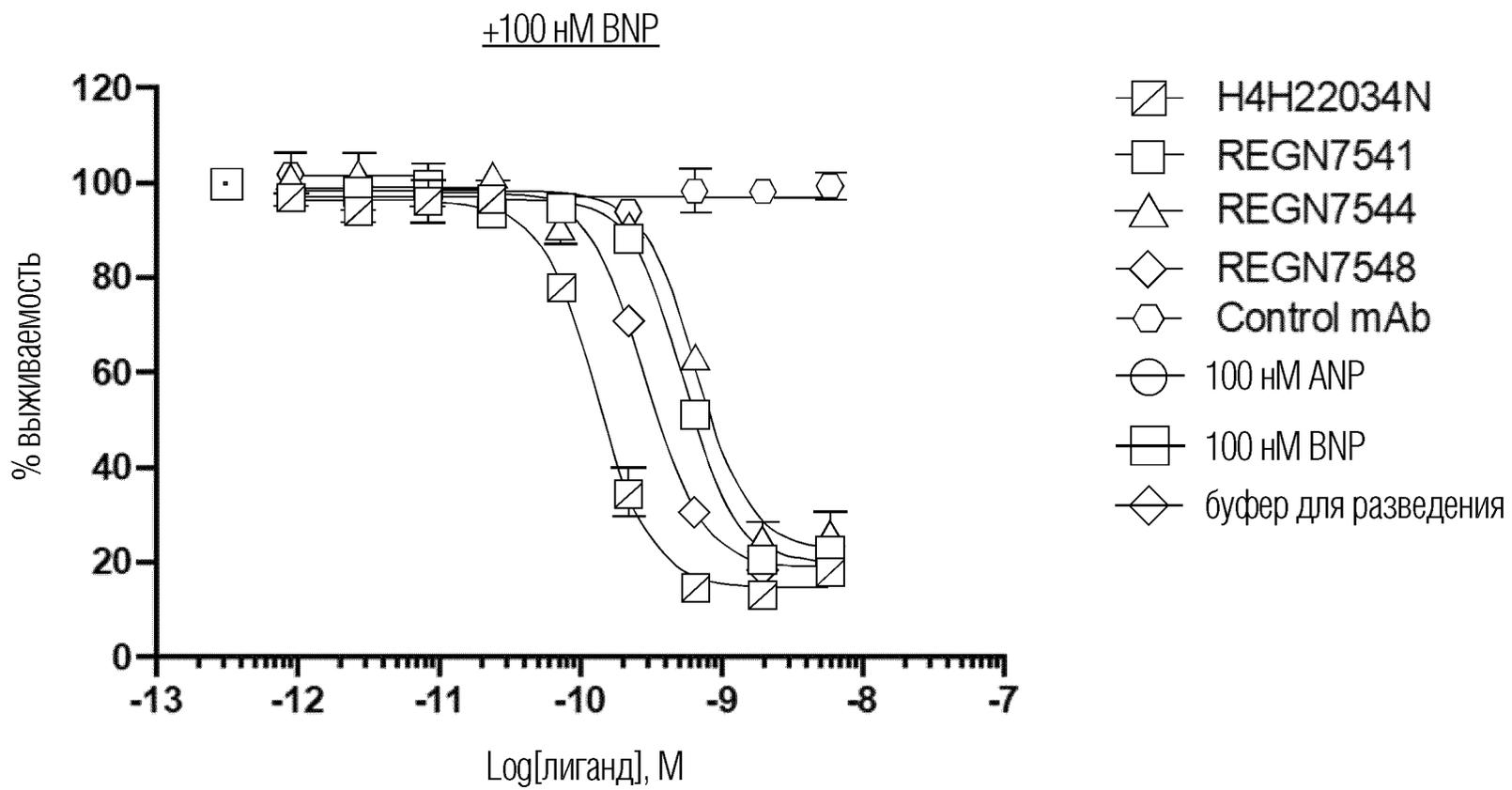


ФИГ. 3А

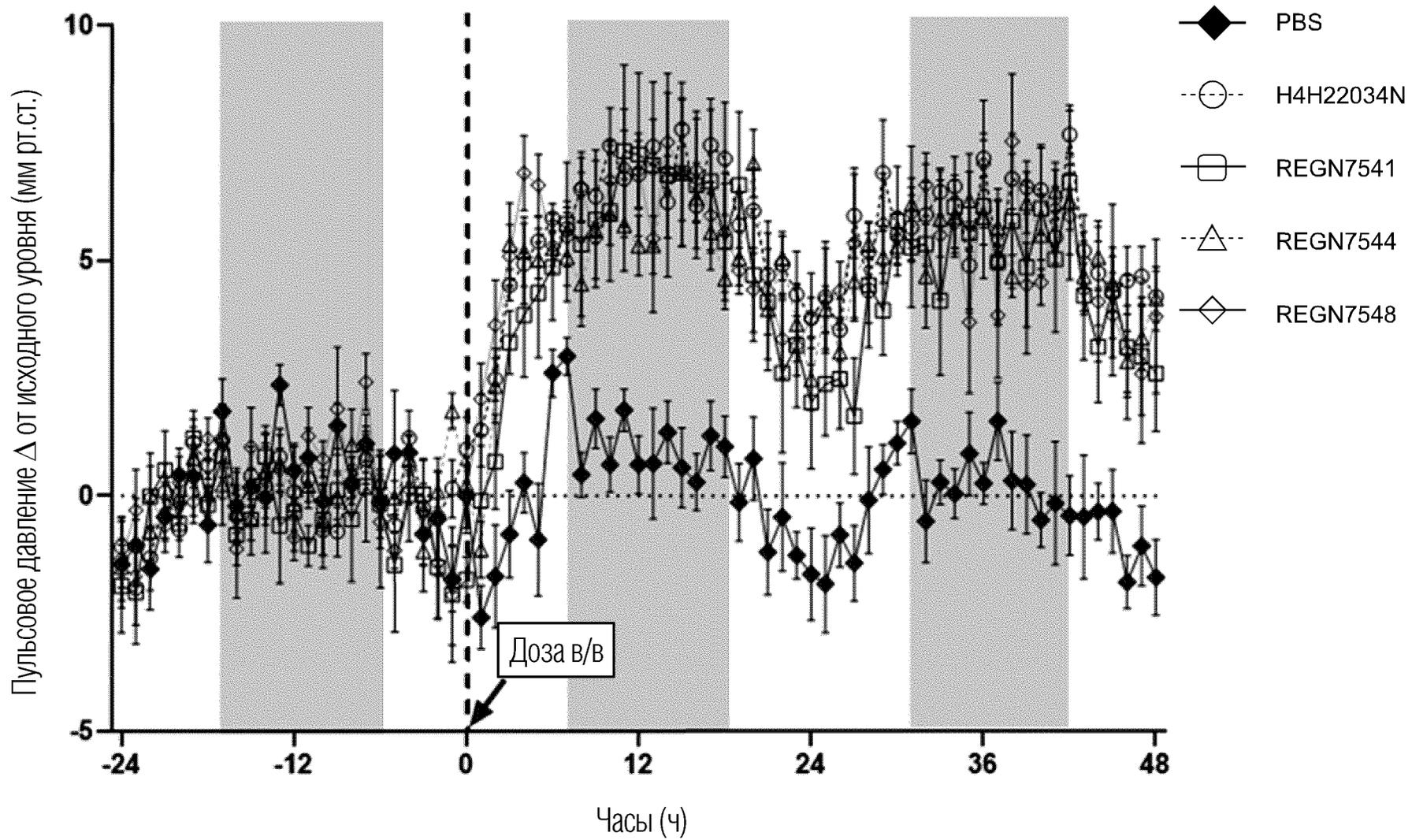
- H4N22034N
- REGN7541
- △ REGN7544
- ◇ REGN7548
- Control mAb
- 100 нМ ANP
- 100 нМ BNP
- ◇ буфер для разведения



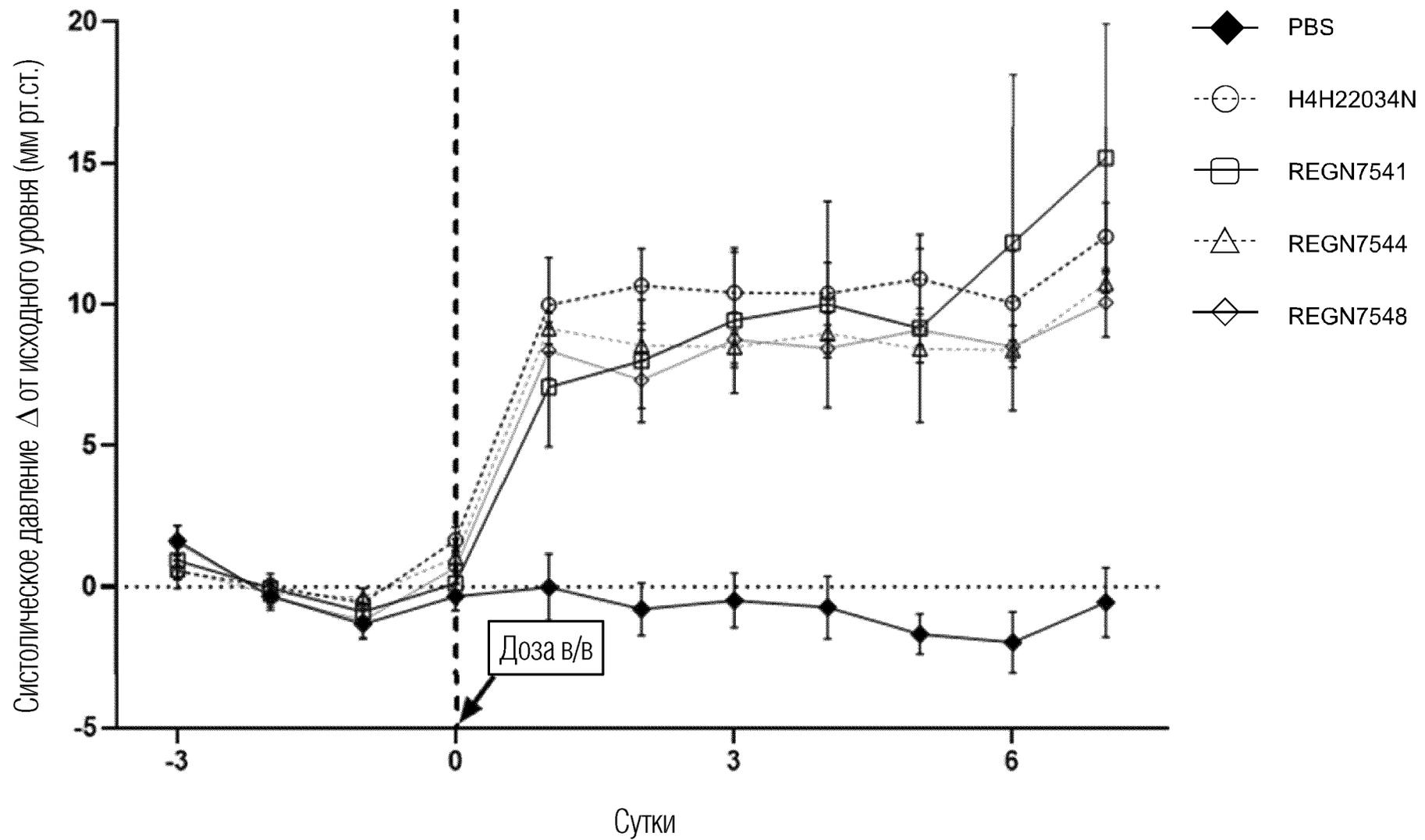
ФИГ. 3В



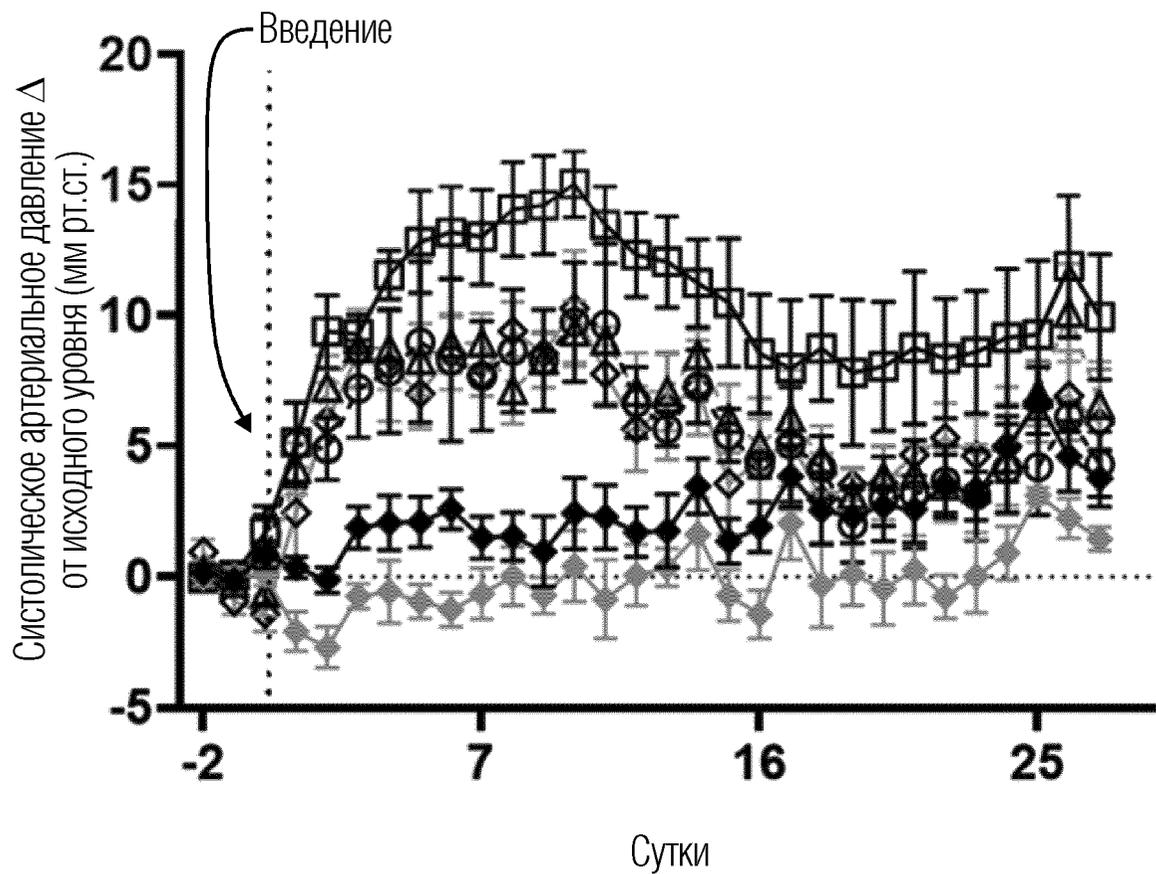
ФИГ. 3С



ФИГ. 4

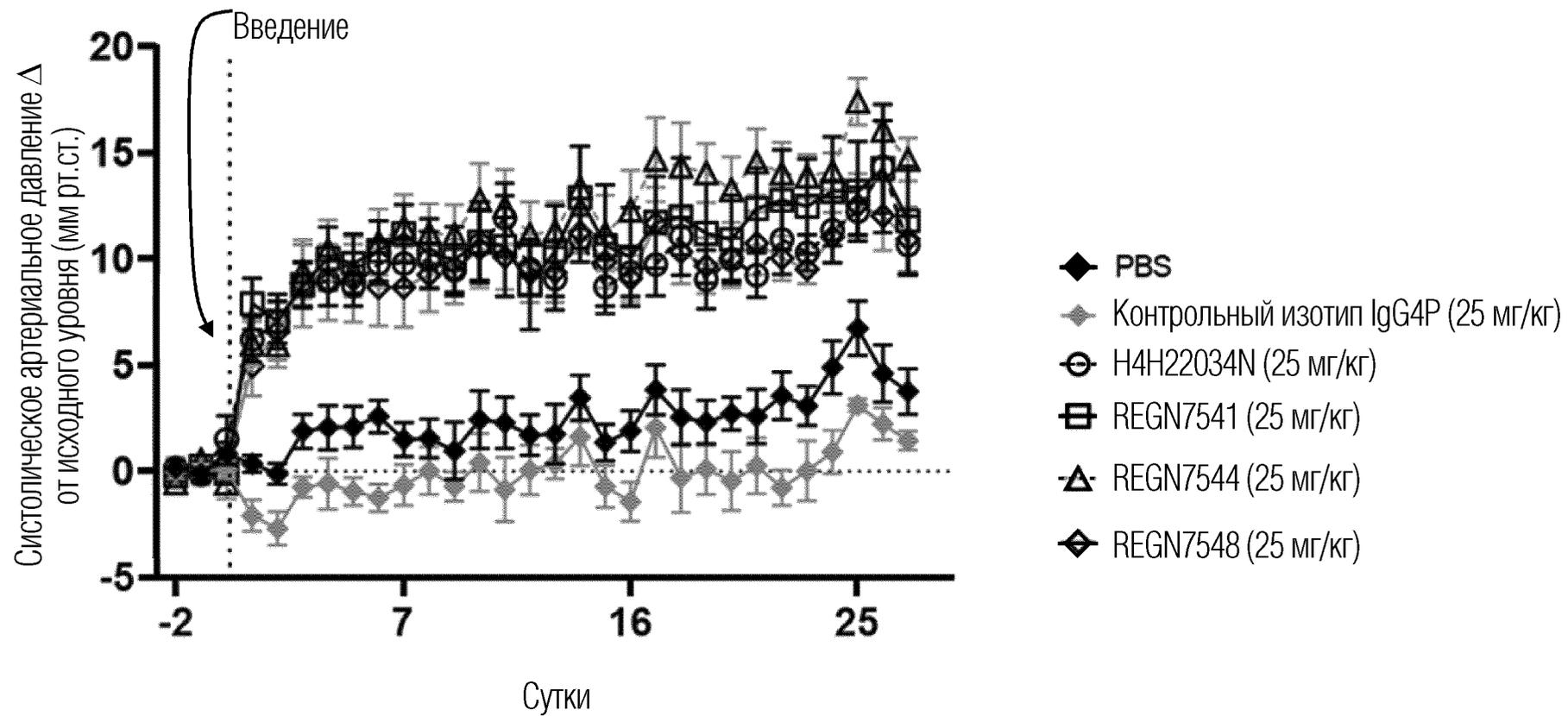


ФИГ. 5

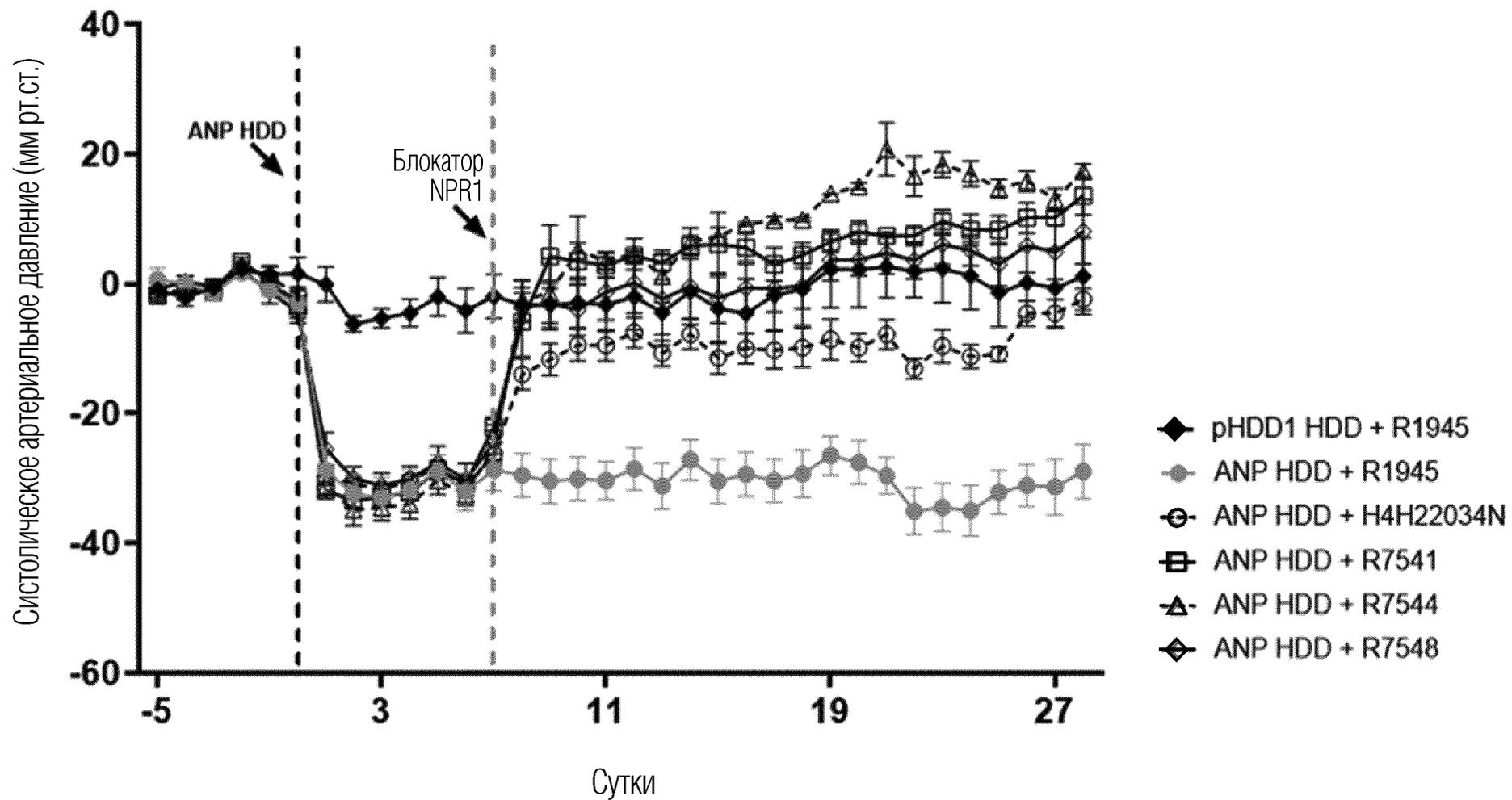


- ◆ PBS
- ◆ Контрольный изотип IgG4P (25 мг/кг)
- H4H22034N (1 мг/кг)
- REGN7541 (1 мг/кг)
- △ REGN7544 (1 мг/кг)
- ◇ REGN7548 (1 мг/кг)

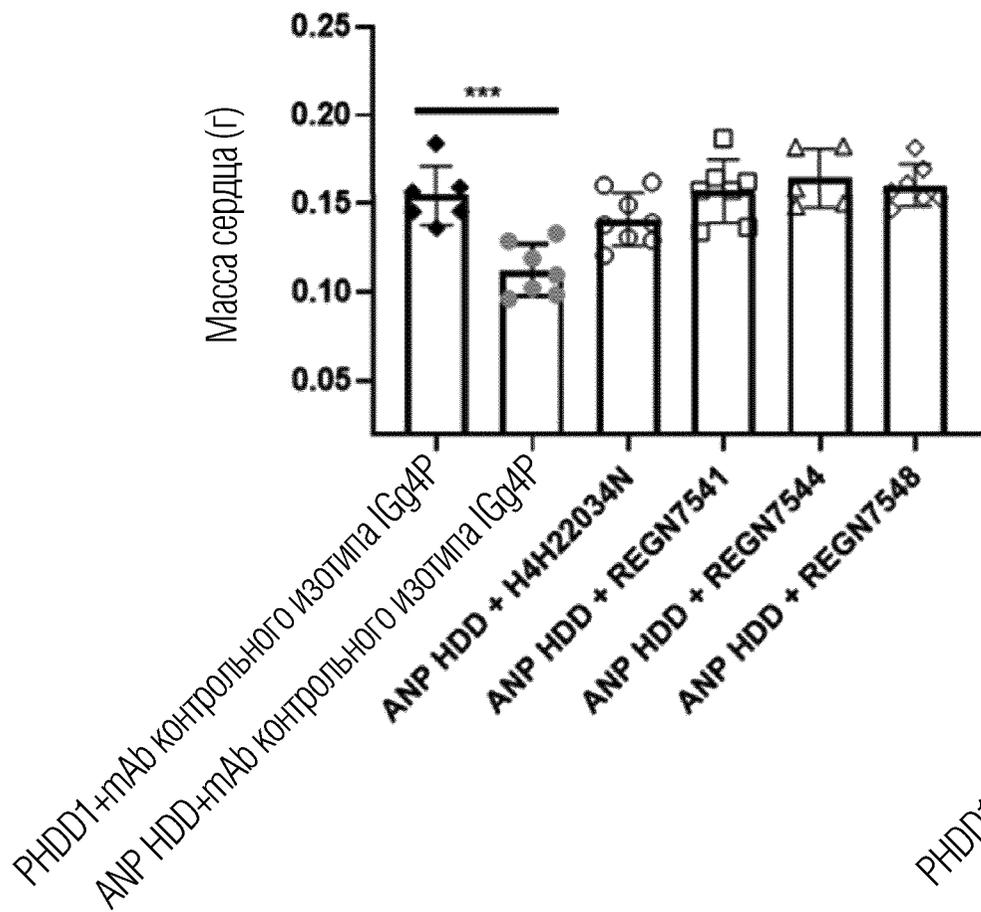
ФИГ. 6



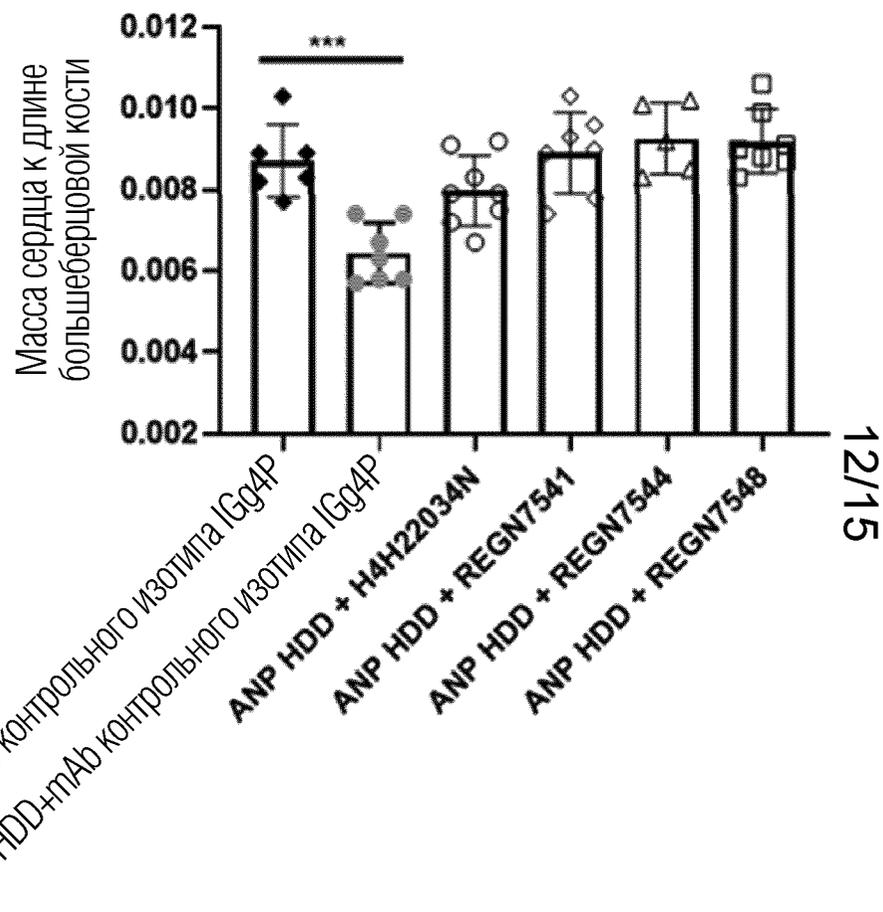
ФИГ. 7



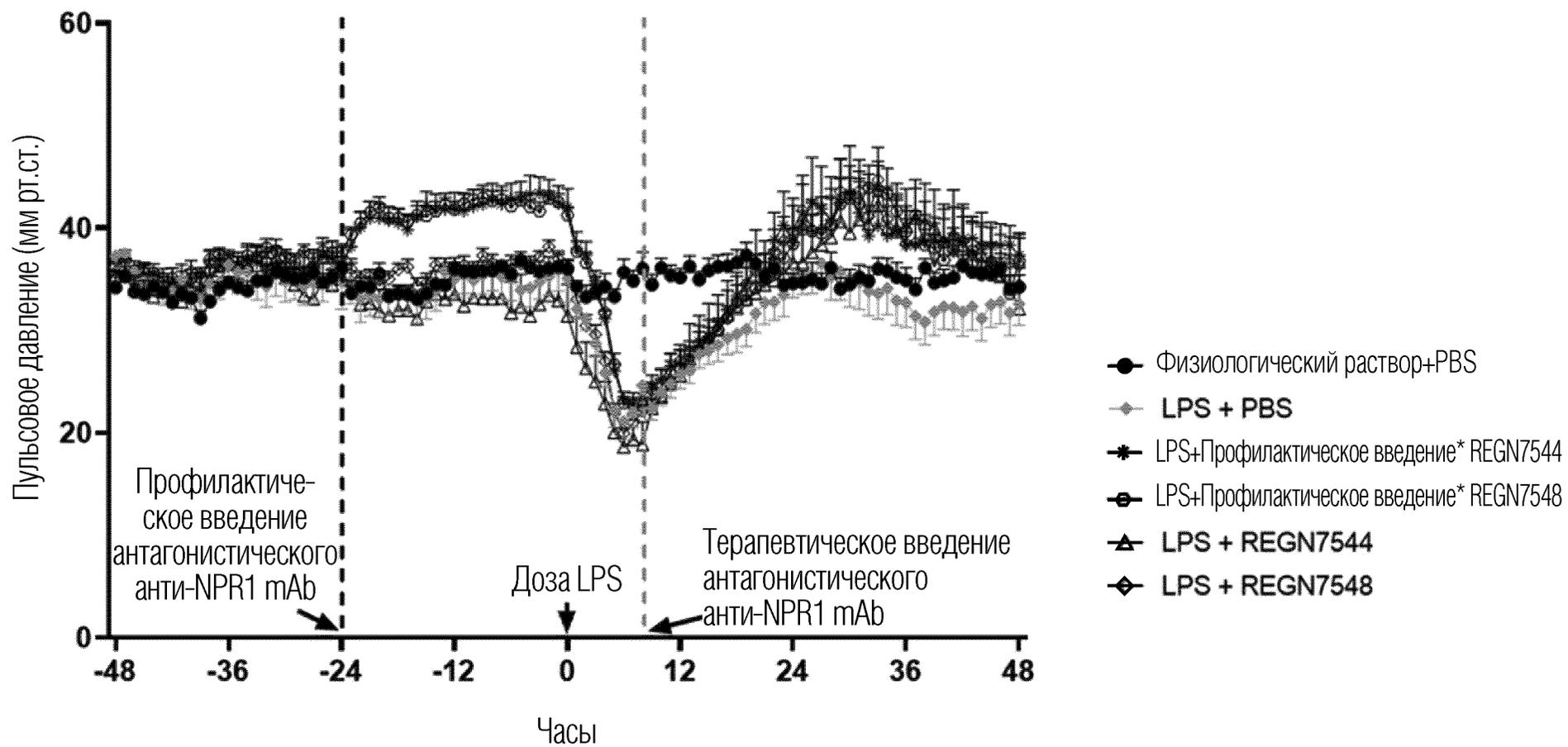
ФИГ. 8



ФИГ. 9А



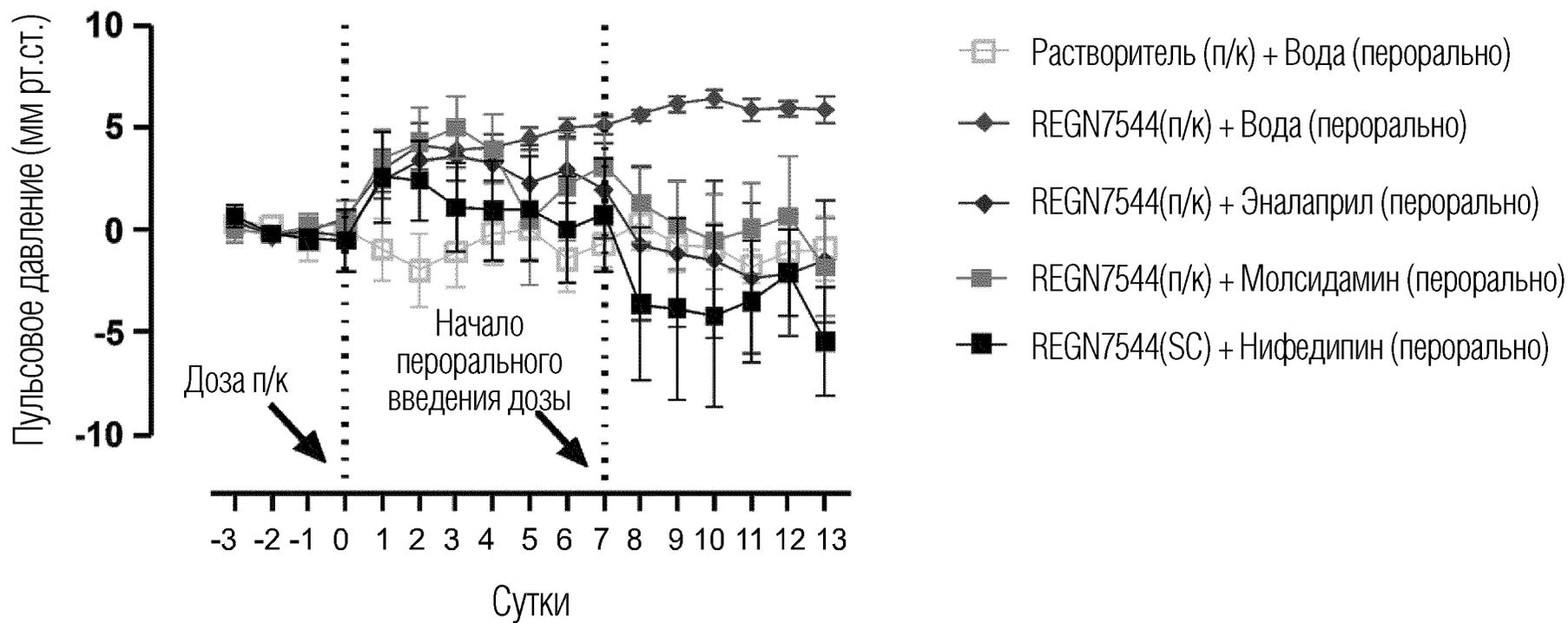
ФИГ. 9В



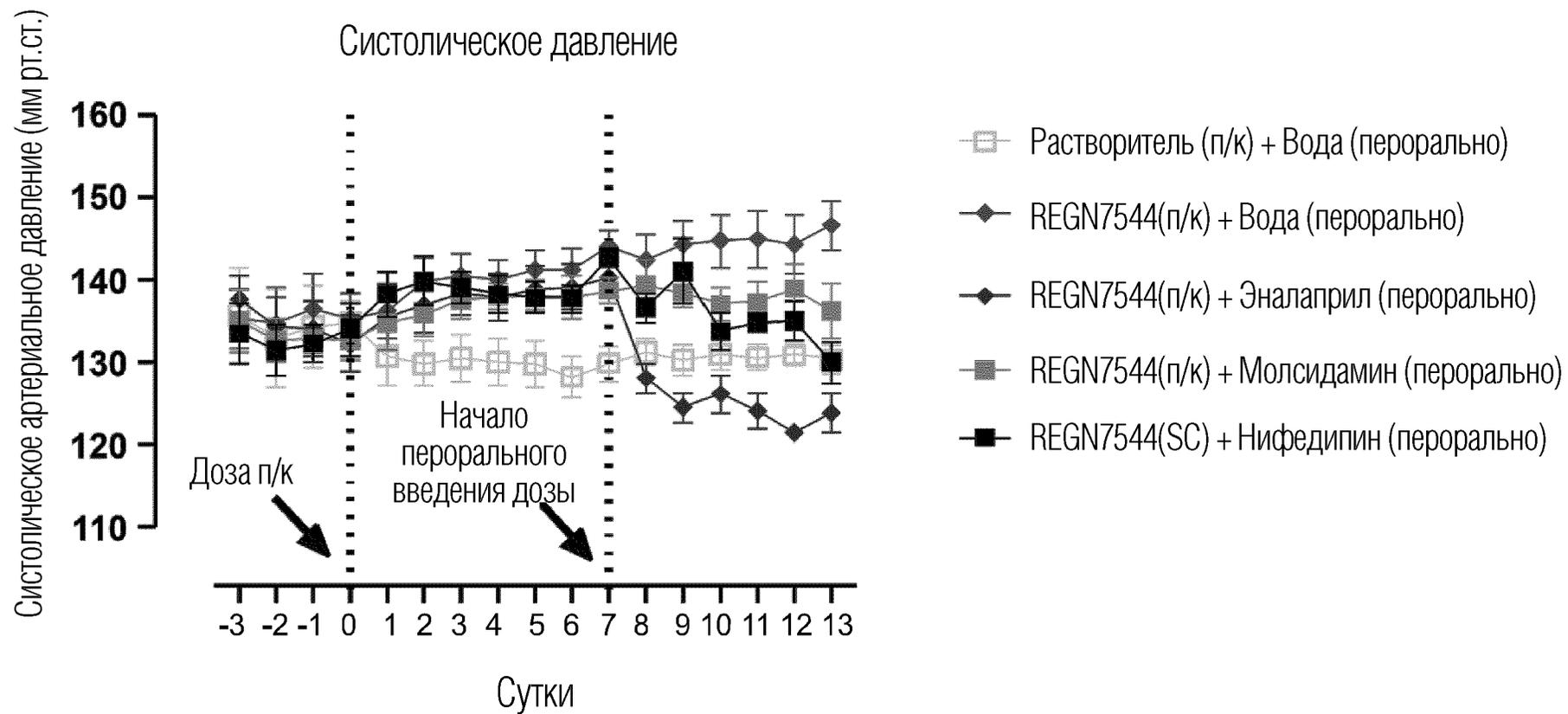
13/15

ФИГ. 10

Пульсовое давление - изменение BL



ФИГ. 11



ФИГ. 12