

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090531** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.09

(22) Дата подачи заявки
2018.08.21

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К АПЕЛИНУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/549,523; 62/579,287; 62/656,586;
62/658,111

(32) 2017.08.24; 2017.10.31; 2018.04.12;
2018.04.16

(33) US

(86) PCT/US2018/047144

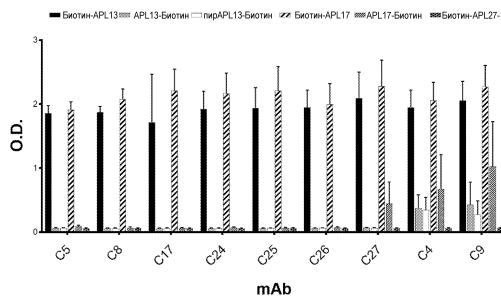
(87) WO 2019/040390 2019.02.28

(71) Заявитель:
ФЕЙНЗ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Ван Минхань, Цзоу Хой, Там Арвин
(US)**

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

(57) Описаны антитела к апелину и антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие эти антитела, композиции, содержащие эти антитела, и способы получения указанных антител и применения этих антител для лечения или профилактики заболеваний, таких как диабетическая ретинопатия (DR), возрастная макулярная дегенерация (AMD), диабетический макулярный отек (DME), макулярный отек после окклюзии вен сетчатки (RVO), дегенерация сетчатки, миопическая хориоидальная неоваскуляризация (mCNP), диабетическая нефропатия, хроническое заболевание почек (CKD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени, неоваскуляризация бляшек, рубец радужной оболочки, неоваскулярная глаукома, неоваскуляризация роговицы (CNV), ретинопатия недоношенных (ROP), ретинопатия, макулярная дегенерация, синдром гиперстимуляции яичников (OHSS), маточное кровотечение, эндометриоз, гиперплазия эндометрия и рак, лейомиомы миометрия, аденомиоз, рак (например, солидные опухоли и гематологические злокачественные новообразования), фиброз и/или связанные с ними осложнения.



A1

202090531

202090531

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561397EA/032

АНТИТЕЛА К АПЕЛИНУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США 62/549,523, поданной 24 августа 2017 года, предварительной заявке на патент США 62/579,287, поданной 31 октября 2017 года, предварительной заявке на патент США 62/656,586, поданной 12 апреля 2018 года, и предварительной заявке на патент США 62/658,111, поданной 16 апреля 2018 года, раскрытие каждой из них включено в настоящее описание во всей полноте в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам к апелину, нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим эти антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим эти векторы, и композициям, содержащим указанные антитела. Также предложены способы получения указанных антител, способы использования этих антител в диагностических целях при измерении уровней апелина в крови и/или ткани и способы применения антител для лечения заболеваний, включая диабетическую ретинопатию (DR; в том числе пролиферативную диабетическую ретинопатию (PDR) и непролиферативную диабетическую ретинопатию (NPDR)), возрастную макулярную дегенерацию (AMD), диабетический макулярный отек (DME), макулярный отек после окклюзии вен сетчатки (RVO), дегенерацию сетчатки, миопическую хориоидальную неоваскуляризацию (mCNV), диабетическую нефропатию, хроническую болезнь почек (CKD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени, неоваскуляризацию бляшек, рубец радужной оболочки, неоваскулярную глаукому, неоваскуляризацию роговицы (CNV), ретинопатию недоношенных (ROP), ретинопатию, макулярную дегенерацию, синдром гиперстимуляции яичников (OHSS), маточное кровотечение, эндометриоз, гиперплазию эндометрия и рак, лейомиомы миометрия, аденомиоз, рак (например, солидные опухоли и гематологические злокачественные новообразования), фиброз (например, патологический и физиологический фиброз, фиброз почек, фиброз миокарда, фиброз печени и фиброз легких) и/или связанные с ними осложнения.

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОЙ ВЕРСИИ

[0003] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с названием файла «689204.1WO Sequence Listing» и датой создания файла 15 августа 2018 года размером 88 кБ. Список последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Апельин представляет собой встречающийся в природе пептид, который имеет несколько эндогенных форм. Сначала он продуцируется в виде предшественника, состоящего из 77 аминокислот, препроапелина, который подвергается протеолитическому процессингу с получением апелина-36 (или апелина 36) (содержащего 36 С-терминальных аминокислот предшественника апелина), апелина-17 (или апелина 17) (содержащего 17 С-терминальных аминокислот препроапелина; K17F) и апелина-13 (или апелина 13) (содержащего 13 С-терминальных аминокислот препроапелина) (Tatemoto et al., *Biochem Biophys Res. Commun.* 251 (2):471-6 (1998); Habata et al., *Biochim Biophys Acta* 1452 (1):25-35 (1999); Lee et al., *J. Neurochem.* 74 (1):34-41 (2000)). Также имеются сообщения о других формах апелина, происходящих из предшественника, состоящего из 77 аминокислот (Mesmin et al., *J Proteome Res.* 10 (11):5222-31 (2011); Shin et al., *Biochim Biophys Acta.* 1861 (8):1901-12 (2017). N-концевой глутаминовый остаток апелина 13 может быть подвержен пироглутамилированию с образованием пироглутамильной формы апелина 13 (pE13F). Апельин является эндогенным лигандом рецептора апелина APJ (также называемого *apelinR*, *AGTRL1* или *APLNR*). APJ является членом семейства генов рецепторов, связанных с G-белком. Апельин связывается и активирует APJ, и запускает широкий спектр нисходящих сигнальных событий, включая подавление индуцируемого форсколином продуцирования цАМФ и стимулирование фосфорилирования внеклеточных сигнальных киназ (ERK), Akt и p70-S6 киназы (De Mota, *Neuroendocrinology* 72(6):400-7 (2000); Li et al., *Front Biosci.* 13:3786-92 (2008); Masri et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 290(1):539-45 (2002); Liu et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 468(4):617-21 (2015); Masri et al., *FASEB J.* 18(15):1909-11 (2004); O'Carroll et al., *J Endocrinol.* 219(1):R13-35 (2013)). Как K17F, так и pE13F могут вызывать интернализацию рецептора APJ. K17F имеет более высокое сродство к APJ, чем pE13F, тогда как апелин-36 имеет сходное сродство к pE13F (Iturrioz et al., *J Biol Chem.* 285 (42):32627-37 (2010); Medhurst et al., *J Neurochem.* 84(5):1162-72 (2003). Как апелин, так и APJ экспрессируются в центральной нервной системе и периферических тканях (O'Carroll et al., *J Endocrinol.* 219(1):R13-35 (2013)). Ось апелин/APJ регулирует многие физиологические функции, включая сократимость сердца, кровяное давление, сердечно-сосудистый тонус, ангиогенез тканей, водный гомеостаз, физиологию желудочно-кишечного тракта, пролиферацию клеток гладких мышц сосудов (VSMC) и других типов клеток, адгезию моноцитов к эндотелиальным клеткам пупочной вены человека, восстановление сердца после инфаркта миокарда и патологический фиброз в нескольких тканях или органах (O'Carroll et al., *J Endocrinol.* 219(1):R13-35 (2013)).

[0005] Апельин играет важную роль в ангиогенезе и пролиферации эндотелиальных клеток (EC) (Kalin et al., *Dev Biol.* 305(2):599-614 (2007); Kasai et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 325(2):395-400 (2004). Как апелин, так и APJ экспрессируются на EC в новых развивающихся кровеносных сосудах во время ангиогенеза (Kidoya et al., *EMBO J.* 27(3):522-34 (2008); Saint-Geniez et al., *Mech Dev.* 110(1-2):183-6 (2002)), и экспрессия апелина индуцируется гипоксией (Kasai et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(11):2182-7

(2010)). У апелин-нокаутных мышей нарушается васкуляризация сетчатки и развитие глаз (Kasai et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(10):1717-22 (2008)), что указывает на важную роль апелина в развитии сетчатки. У пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией (PDR) концентрация апелина в стекловидном теле выше, чем у людей без диабета (Tao et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(8):4237-42 (2010)). Повышенный уровень апелина может оказывать сильное ангиогенное и пролиферативное действие и приводить к патологическим изменениям в сетчатке при диабете и других заболеваниях глаз. Апелин-нейтрализующее моноклональное антитело (mAb) может специфически связываться с апелином и блокировать его биологическую активность в клетках, которые экспрессируют рецептор апелина APJ; его также можно назвать mAb к апелину с нейтрализующей активностью. Такие агенты, как нейтрализующее апелин mAb, можно использовать для лечения диабетической ретинопатии (DR), возрастной макулярной дегенерации (AMD) и диабетического макулярного отека (DME). Поскольку ось апелин/APJ может работать совместно с путем VEGF, комбинация апелин-нейтрализующего mAb с блокатором VEGF, таким как ранибизумаб (Lucentis®), может иметь аддитивный или даже синергетический терапевтический эффект у пациентов с DR, DME, AMD и/или другими заболеваниями глаз. Аналогичный эффект может иметь биспецифическое антитело, которое нацелено как на апелин, так и на VEGF.

[0006] Было показано, что апелин-13 стимулирует пролиферацию опухолей при различных типах рака, включая рак молочной железы, гепатоцеллюлярный рак, лимфатический рак, рак легких и яичников. Экспрессия апелина и APJ усиливается в различных опухолях (Sorli et al., *Oncogene.* 26(55):7692-9 (2007); Picault et al., *Eur J. Cancer.* 50(3):663-74 (2014); Zuurbier et al., *Oncotarget.* 8(26):42949-42961 (2017); Muto et al., *Anticancer Res.* 34(10):5313-20 (2014)). Апелин является мощным активатором неоангиогенеза и пролиферации опухоли за счет связывания и активации его рецептора APJ (Sorli et al., *Drug Discov Today.* 11(23-24):1100-6 (2006)). Таким образом, блокада действия апелина с помощью нейтрализующего апелин mAb может быть использована для лечения различных видов рака, в которых ось апелин/APJ играет роль в росте раковых клеток и/или ангиогенезе вблизи участка локализации опухоли. Нейтрализующее апелин mAb можно комбинировать с авастином (Avastin®) или другими анти-VEGF и/или антиангиогенными агентами для достижения аддитивного или даже синергетического эффекта при лечении рака. Кроме того, для увеличения эффективности нейтрализующее апелин mAb может быть объединено с другими противораковыми агентами, такими как агенты для химиотерапии, ингибирования роста опухоли или иммуноонкологической терапии.

[0007] Апелин также связан с заболеваниями печени. Он сверхэкспрессируется в активированных звездчатых клетках печени (HSC) у страдающих циррозом крыс и играет важную роль как в ангиогенезе, так и в развитии фиброза у этих животных (Principe et al., *Hepatology.* 48(4):1193-201 (2008)). Апелин также сверхэкспрессируется в HSC пораженной циррозом печени человека (Melgar-Lesmes et al., *Endocrinology.* 151(11):5306-

14 (2010)), как и APJ (Yokomori et al., J Gastroenterol. 46(2):222-31 (2011)). С другой стороны, и гипоксия, и провоспалительные факторы усиливают экспрессию APJ в HSC и гепатоцитах человека. У пациентов с циррозом печени повышен уровень апелина в сыворотке крови. Кроме того, уровень апелина в сыворотке связан с тяжестью хронического заболевания печени. Эти данные свидетельствуют о том, что апелин может играть важную роль в патогенезе заболеваний печени, таких как неалкогольный стеатогепатит (NASH), фиброз печени и цирроз печени. Апелин-нейтрализующее mAb может быть использовано для лечения этих заболеваний печени.

[0008] Было показано, что апелин способствует развитию диабетической нефропатии у грызунов за счет усиления проницаемости гломерулярных эндотелиальных клеток и индукции дисфункции подоцитов (Guo et al., J Cell Mol Med. 19(9):2273-85 (2015)). Также было обнаружено, что он участвует в прогрессировании диабетической нефропатии путем ингибирования аутофагии в подоцитах (Liu et al., Cell Death Dis. 8(8):e3006 (2017)). Таким образом, нейтрализующее апелин mAb может быть использовано при лечении диабетической нефропатии и хронического заболевания почек.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] Согласно одному общему аспекту, изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с апелином.

[0010] Предлагаются выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 168, 169, 170, 171, 102 и 172, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 50, 51, 52, 110, 111 и 112, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 173, 174, 175, 176, 114 и 115, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 68, 177, 178, 128, 129 и 130, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 74, 75, 76, 134, 135 и 136, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 179, 78, 180, 137, 138 и 139, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 83, 84, 85, 143, 144 и 145, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 86, 87, 88, 146, 147 и 148, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 89, 90, 91, 149, 150 и 151, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 92, 93, 94, 152, 153 и 154, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 95, 96, 97, 155, 156 и 157, соответственно; или
- (12) SEQ ID NO: 98, 99, 100, 158, 159 и 160, соответственно;

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с апелином, предпочтительно человеческим апелином. SEQ ID NO: 168 представлена аминокислотной последовательностью X_1NRX_2S , где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из S или T, и X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную

из M или V. SEQ ID NO: 169 представлена аминокислотной последовательностью SIGSSPW_{X1}ASWAX₂G, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из Y или F, и X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из Q или L. SEQ ID NO: 170 представлена аминокислотной последовательностью GGYRPGX₁SX₂, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из A или G, и X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из V или I. SEQ ID NO: 171 представлена аминокислотной последовательностью QSSQSVYDNNDLX₁, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из A или G. SEQ ID NO: 172 представлена аминокислотной последовательностью AGGYX₁GDIYT, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из S или N. SEQ ID NO: 173 представлена аминокислотной последовательностью X₁YAX₂D, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из N или S, и X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из M или I. SEQ ID NO: 174 представлена аминокислотной последовательностью VIAPNX₁X₂TX₃YPTWARG, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из R, G или H, X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из R, A или Y, и X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из Y или C. SEQ ID NO: 175 представлена аминокислотной последовательностью YPIX₁X₂GX₃NI, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из E или D, X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из P, A, S или T, и X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из A или S. SEQ ID NO: 176 представлена аминокислотной последовательностью QSSESVX₁X₂NNQLS, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из D или G, и X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из Y, N или M. SEQ ID NO: 177 представлена аминокислотной последовательностью VIAPSX₁TTYYPWTAKG, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из G или S. SEQ ID NO: 178 представлена аминокислотной последовательностью YPIDPGSNX₁, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из I или V. SEQ ID NO: 179 представлена аминокислотной последовательностью X₁X₂AMD, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из N или S, и X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из Y или H. SEQ ID NO: 180 представлена аминокислотной последовательностью YPIDX₁GANV, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из V или A.

[0011] Также предлагаются выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие:

а. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2;

б. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4;

с. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и варибельную область легкой цепи, имеющую

д. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 33, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34;

е. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 35, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 36;

ж. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 37, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 38; или

з. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 40.

[0012] Также предлагаются выделенные моноклональные антитела к аполину или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 188. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, ингибировать активность аполина. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, специфически связываться с пиро-аполином-13, аполином-13, аполином-17, аполином-36, аполином-55 и/или другими формами аполина, которые имеют такой же С-терминальный конец, как и аполин-13.

[0013] Также предлагаются выделенные моноклональные антитела к аполину или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, ингибировать активность аполина. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, специфически связываться с аполином-13 и пиро-аполином-13.

[0014] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

[0015] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 211, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

б. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 212, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

в. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность SEQ ID NO: 213, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

d. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 214, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

e. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 213, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 216;

f. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 214, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 216;

g. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 219; или

h. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 220.

[0016] Также предлагаются выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, раскрытые в настоящем описании.

[0017] Также предлагаются векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

[0018] Также предлагаются клетки-хозяева, содержащие векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

[0019] В некоторых вариантах осуществления предлагается фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[0020] Также предлагаются способы блокирования связывания апелина с рецептором апелина у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0021] Также предлагаются способы лечения диабетической ретинопатии (DR) у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0022] Также предлагаются способы лечения возрастной макулярной дегенерации (AMD) у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0023] Также предлагаются способы лечения диабетического макулярного отека

(DME) у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0024] Также предлагаются способы лечения макулярного отека после окклюзии вен сетчатки (RVO) у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0025] Также предлагаются способы лечения дегенерации сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0026] Также предлагаются способы лечения миопической хориоидальной неоваскуляризации (mCNV) у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0027] Также предлагаются способы лечения диабетической нефропатии у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0028] Также предлагаются способы лечения хронического заболевания почек (CKD) у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0029] Также предлагаются способы лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0030] Также предлагаются способы лечения фиброза тканей у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0031] Также предлагаются способы лечения цирроза печени у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0032] Также предлагаются способы лечения неоваскуляризации бляшек у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0033] Также предлагаются способы лечения рубеоза радужной оболочки у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0034] Также предлагаются способы лечения неоваскулярной глаукомы у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0035] Также предлагаются способы лечения неоваскуляризации роговицы (CNV) у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0036] Также предлагаются способы лечения ретинопатии недоношенных (ROP) у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических

композиций по изобретению.

[0037] Также предлагаются способы лечения ретинопатии у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0038] Также предлагаются способы лечения макулярной дегенерации у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0039] Также предлагаются способы лечения синдрома гиперстимуляции яичников (OHSS) у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0040] Также предлагаются способы лечения маточного кровотечения у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0041] Также предлагаются способы лечения эндометриоза у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0042] Также предлагаются способы лечения гиперплазии эндометрия и рака у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0043] Также предлагаются способы лечения лейомиом миометрия у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0044] Также предлагаются способы лечения аденомиоза у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0045] Также предлагаются способы лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению. Рак может представлять собой любой вид гемобластоza или солидного рака, например, он может быть выбран, без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточного рака, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, холангиокарциномы, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфобластного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других видов гемобластоza.

[0046] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит второй терапевтический противораковый агент. Второй терапевтический противораковый агент может, например, представлять собой анти-VEGF

средство. Анти-VEGF средство может представлять собой, например, авастин (Avastin®) или биологически аналогичное средство бевацизумаб. Анти-VEGF средство может, например, представлять собой блокатор VEGFR1 и/или VEGFR2.

[0047] Также предлагаются способы определения уровня апелина у субъекта. Способы включают (а) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (с) определение уровня апелина у субъекта. В определенных вариантах осуществления образец представляет собой образец ткани. Образец ткани может, например, представлять собой образец раковой ткани, образец ткани печени или образец ткани почки.

[0048] Также предлагаются способы получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающие культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продуцирования моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

[0049] Также предлагаются способы получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающие объединение моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0050] Приведенная выше сущность изобретения, а также приведенное ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будет лучше понято при изучении со ссылкой на прилагаемые чертежи. Однако следует понимать, что применение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

[0051] На фиг. 1A-1C показано измеренное с помощью ELISA связывание mAb к апелину с различными биотинилированными пептидами группы апелина. Биотинилированные пептиды группы апелина иммобилизовали на планшетах для ELISA, покрытых нейтравидином, и добавляли очищенные рекомбинантные кроличьи mAb к апелину для связывания с пептидами на планшетах. Связывание детектировали путем добавления козьего Fc-специфического антитела к кроличьему IgG, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и субстрат PNPP и измеряли в виде поглощения при 405 нм. На фиг.1A представлен график, демонстрирующий измеренное с помощью ELISA связывание mAb к апелину C5, C8, C17, C24, C25, C26, C27, C4 и C9 с различными биотинилированными пептидами группы апелина. На фиг.1B показан график, демонстрирующий измеренное с помощью ELISA связывание mAb к апелину C1, C6, C7, C10, C12 и C16 с различными биотинилированными пептидами группы апелина. На фиг.1C показан график, демонстрирующий измеренное с помощью ELISA связывание mAb к апелину C11, C14, C22, C20 и C13 с различными биотинилированными пептидами

группы апельина.

[0052] На фиг. 2А-2К показан нейтрализующий эффект отдельных mAb к апельину в клеточном анализе активности апельина. Активность апельина оценивали по его способности подавлять продуцирование цАМФ, индуцированное форсколином (FSK), в клетках cAMP HunterTM CHO-K1 AGTRL1 Gi (DiscoverX # 95-0147C2). Каждое mAb анализировали в трех повторах при заданном разведении. Для вычисления % ингибирования mAb при заданной концентрации процент ингибирования, равное 0%, определяли как сигнал от FSK-стимулированных клеток при обработке апельсином, а ингибирование, равное 100%, определяли как сигнал от FSK-стимулированных клеток без обработки апельсином. Ингибирование в % наносили на график зависимости от возрастающих концентраций mAb. На фиг. 2А показан график активности mAb к апельину C1. На фиг. 2В показан график активности mAb к апельину C6. На фиг. 2С показан график активности mAb к апельину C7. На фиг. 2D показан график активности mAb к апельину C8. На фиг. 2Е показан график активности mAb к апельину C24. На фиг. 2F показан график активности mAb к апельину C25. На фиг. 2G показан график активности mAb к апельину C10. На фиг. 2H показан график активности mAb к апельину C11. На фиг. 2I показан график активности mAb к апельину C12. На фиг. 2J показан график активности mAb к апельину C22. На фиг. 2K показан график активности mAb к апельину C26.

[0053] На фиг. 3А-3С показаны графики, демонстрирующие измеренного с помощью ELISA ингибирование связывания биотин-апельина-13 (SEQ ID NO: 165) с mAb к апельину C8, C24 и C25, обусловленное конкурентными пептидами, приведенными в таблице 7. Козьи антитела к кроличьим IgG иммобилизовали на планшете для ELISA. Смесь кроличьего mAb к апельину (C8, C24 или C25) и конкурентного пептида предварительно инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, а затем добавляли биотин-апельин-13 (SEQ ID NO: 165), смешивали, и конечный раствор добавляли в планшет. Связывание биотин-апельина-13 (SEQ ID NO: 165) с иммобилизованными mAb к апельину C8 (фиг. 3А), C24 (фиг. 3В) и C25 (фиг. 3С) детектировали путем добавления стрептавидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и субстрата PNPP и измеряли в виде поглощения при 405 нм.

[0054] На фиг. 4А-4С показаны графики, демонстрирующие измеренное с помощью ELISA ингибирование связывания биотин-апельина-13 (SEQ ID NO: 165) с mAb к апельину C8, C24 и C25, обусловленное пептидами, полученными методом аланин-сканирующего мутагенеза (таблица 8) из эпитопа 8-13 (KGPMPPF) (SEQ ID NO: 188)). Козьи антитела к кроличьим IgG иммобилизовали на планшете для ELISA. Смесь кроличьих mAb к апельину (C8, C24 или C25) и полученного методом аланин-сканирующего мутагенеза пептида предварительно инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, а затем добавляли биотин-апельин-13 (SEQ ID NO: 165), смешивали, и конечный раствор добавляли в планшет. Связывание биотин-апельина-13

(SEQ ID: 165) с иммобилизованными mAb к апелину C8 (фиг. 4A), C24 (фиг. 4B) и C25 (фиг. 4C) детектировали путем добавления стрептавидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и субстрата PNPP и измеряли в виде поглощения при 405 нм. Несколько конкурентных пептидов использовали в качестве контролей.

[0055] На фиг.5A-5C показаны графики, демонстрирующие измеренное с помощью ELISA ингибирование связывания апелин-13-биотина ((QRPRLSHKGPMPPF-биотин (SEQ ID NO: 165)) с mAb к апелину C1, C6 и C7, обусловленное конкурентными пептидами, приведенными в таблице 9. Козьи антитела к кроличьим IgG иммобилизовали на планшете для ELISA. Смесь кроличьего mAb к апелину (C1, C6 или C7) и конкурентного пептида предварительно инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, а затем добавляли апелин-13-биотин (SEQ ID NO: 165), перемешивали, и конечный раствор добавляли в планшет. Связывание апелин-13-биотина (SEQ ID NO: 165) с иммобилизованными mAb к апелину C1 (фиг. 5A), C6 (фиг.5B) и C7 (фиг.5C) определяли путем добавления стрептавидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и субстрата PNPP и измеряли в виде поглощения при 405 нм.

[0056] На фиг.6A-6B показаны графики, демонстрирующие ингибирование связывания апелин-13-биотина (SEQ ID NO: 165) с mAb к апелину C6 (фиг.6A) и C7 (фиг.6B), обусловленное пептидами (таблица 10), полученными методом аланин-сканирующего мутагенеза из эпитопа 1-5 (QRPRL (SEQ ID NO: 204)), измеренное с помощью ELISA, как описано выше.

[0057] На фиг.7A-7B показаны кривые IC_{50} гуманизированного mAb к апелину A31, полученные по результатам клеточного анализа. Активность апелина оценивали по его способности подавлять продуцирование цАМФ, индуцированное форсколином (FSK), в клетках cAMP HunterTM CHO-K1 AGTRL1 Gi (DiscoverX # 95-0147C2), а активность mAb к апелину оценивали по его способности восстанавливать ингибирующий эффект апелина. На фиг. 7A показан график IC_{50} , когда в анализе использовали апелин 13 (APL13). На фиг. 7B показывает график IC_{50} , когда в анализе использовали пиро-апелин 13 (pyroAPL13). CPS - количество импульсов в секунду.

[0058] На фиг. 8 показано влияние гуманизированного mAb к апелину A31 на рост опухоли на модели ксенотрансплантата. mAb тестировали отдельно или в комбинации с бевацизумабом; также выполняли тестирование только бевацизумаба.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0059] В разделе «Уровень техники» и в описании приведены ссылки и описаны различные публикации, статьи и патенты; каждый из этих документов включен в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей или т.п., включено в настоящее описание для раскрытия контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что каждый из обсуждаемых вопросов являются частью предшествующего уровня техники, относящегося к любому раскрытому или заявленному изобретению.

[0060] Если не указано иное, все технические и научные термины, которые

используются в настоящем описании, имеют те же самые значения, как их обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В противном случае определенные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значения, указанные в описании.

[0061] Следует отметить, что используемые в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста в явном виде не следует иное.

[0062] Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящей заявке, во всех случаях следует рассматривать как модифицированные термином «примерно». Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 до 1,1 мг/мл. Аналогично, диапазон концентраций от 1% до 10% (мас./об.) включает от 0,9% (мас./об.) до 11% (мас./об.). В контексте настоящего описания, использование числового диапазона в явном виде включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в этом диапазоне, включая целые числа и дробные значения в таких диапазонах, если из контекста в явном виде не следует иное.

[0063] Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу серии. Специалистам в данной области будет понятно, или они смогут определить путем проведения обычных общепринятых экспериментов множество вариантов осуществления изобретения, эквивалентных раскрытым в настоящем описании. Такие эквиваленты входят в объем настоящего изобретения.

[0064] Используемые в настоящем описании термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «имеет в составе» или «имеющий в составе» или любой другой их вариант, означают включение указанного целого числа или группы целых чисел, а не исключение какого-либо другого целого числа или группы целых чисел, и их следует понимать как неисключающие или открытые. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит список элементов, не обязательно ограничено только этими элементами, но могут включать другие элементы, не перечисленные в явном виде или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если в явном виде не указано иное, союз «или» относится к включающему «или», а не исключающему «или». Например, условие А или В удовлетворяется любым из следующих условий: А является истинным (или присутствует), а В является ложным (или не присутствует), А является ложным (или не присутствует), а В является истинным (или присутствует), и оба А и В верны (или присутствуют).

[0065] Используемый в настоящем описании термин «и/или» между несколькими перечисленными элементами следует понимать как охватывающий как отдельные, так и объединенные варианты. Например, когда два элемента соединены союзом «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго.

Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения первого и второго элементов вместе. Все эти варианты входят в объем указанного значения и, следовательно, удовлетворяют требованию термина «и/или», используемого в настоящем описании. Понятно, что возможность одновременного применения более чем одного из указанных вариантов соответствует указанному значению и, следовательно, удовлетворяет требованию термина «и/или».

[0066] В контексте настоящей заявки, термин «состоит из» или его варианты, такие как «состоят из» или «состоящий из», используемые в описании и формуле изобретения, указывает на включение любого приведенного целого числа или группы целых чисел, но при этом никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не может быть добавлена в указанный метод, структуру или композицию.

[0067] В контексте настоящей заявки, термин «по существу состоит из» или его варианты, такие как «по существу состоят из» или «по существу состоящий из», используемый в описании и формуле изобретения, указывает на включение любого приведенного целого числа или группы целых чисел, и необязательное включение любого приведенного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного метода, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

[0068] В контексте настоящего описания, термин «субъект» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека. Используемый в настоящем описании термин «млекопитающее» включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т.д., более предпочтительно человека.

[0069] Слова «вправо», «влево», «ниже» и «выше» обозначают направления на чертежах, на которые дается ссылка.

[0070] Следует также понимать, что термины «примерно», «приблизительно», «в целом», «по существу» и аналогичные термины, используемые в настоящем описании при ссылке на размер или характеристику компонента предпочтительного варианта изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных отклонений от указанных значений, которые являются функционально одинаковыми или аналогичными, что является понятным специалисту в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, включают разброс значений, который с точки зрения математических и производственных принципов, принятых в данной области техники (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т.д.), не приведет к изменению наименее значащей цифры.

[0071] Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, антител к

апелину, полипептидов апелина и полинуклеотидов, которые их кодируют), относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для определения максимального соответствия, измеренного с помощью одного из приведенных ниже алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального контроля.

[0072] Для сравнения последовательностей одна последовательность обычно используется как эталонная последовательность, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты подпоследовательности, и назначают параметры программы для алгоритма сравнения последовательностей. Затем с помощью алгоритма сравнения последовательностей вычисляют процент идентичности последовательности для тестируемых последовательностей относительно эталонной последовательности на основе параметров программы.

[0073] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть выполнено, например, при помощи алгоритма локальной гомологии Смита-Уотермана (Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)), алгоритма парного выравнивания Нидлмана-Вунша (Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)), методом поиска подобия Липмана-Пирсона, (Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)), путем реализации этих алгоритмов в виде компьютерных программ (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете Wisconsin Genetics Software, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или путем визуальной оценки (см., например, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

[0074] Примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны у Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для анализа BLAST доступно через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высоким количеством очков (HSP) путем идентификации коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому пороговому положительному количеству очков T при выравнивании со словом той же длины в последовательности из базы данных. T называют порогом количества очков для слов в определенной окрестности (Altschul et al., выше). Указанные исходные совпадения соседних слов в окрестности действуют как начало для инициации поиска для нахождения содержащих их HSP. Поиск совпадения слов продолжают в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока можно увеличивать

суммарное количество очков выравнивания.

[0075] Суммарное количество очков для нуклеотидных последовательностей вычисляют с помощью параметров M (очки вознаграждения за пару совпадающих остатков; всегда > 0) и N (штрафные очки за несовпадающие остатки; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей для подсчета суммарного количества очков используется матрица подсчета очков. Продолжение поиска совпадения слов в каждом направлении прекращают, когда: суммарное количество очков выравнивания уменьшается на количество X по сравнению с его достигнутым максимальным значением; суммарное количество очков опускается до нуля или ниже в результате суммирования одного или нескольких отрицательно оцениваемых выравниваний остатков; или достигается конец какой-либо последовательности. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLAST (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используется длина слов (W), равная 11, ожидание (E) - 10, $M=5$, $N = -4$, и сравнение обеих нитей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLAST по умолчанию используется длина слов (W), равная 3, ожидание (E) - 10 и матрица подсчета очков BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

[0076] Дополнительно к вычислению процента идентичности последовательности алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одной из мер сходства, предусмотренных алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая является показателем вероятности, с которой случайно может иметь место совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями. Например, последовательность нуклеиновой кислоты считается сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой последовательности нуклеиновой кислоты со второй эталонной нуклеиновой кислотой составляет меньше примерно 0,1, более предпочтительно, меньше примерно 0,01, и наиболее предпочтительно, меньше примерно 0,001.

[0077] Дополнительным указанием на то, что две последовательности нуклеиновых кислот или полипептидов являются по существу идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реактивным с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно является по существу идентичным второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим указанием на то, что две последовательности нуклеиновых кислот являются по существу идентичными, является то, что две молекулы гибридизуются друг с другом в жестких условиях.

[0078] Используемые в настоящем описании термины «ингибировать», «ингибирующий» и «ингибирование» означают уменьшение активности, ответа,

состояния, заболевания или другого биологического параметра. Эти термины могут включать, без ограничения, полное подавление активности, реакции, состояния или заболевания. Они также могут включать, например, снижение активности, ответа, состояния или заболевания на 10% по сравнению с нативным или контрольным уровнем. Таким образом, снижение может составлять 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%, или снижение может быть любым промежуточным значением между указанными относительно нативного или контрольного уровня. В качестве неограничивающего примера антитело по изобретению может ингибировать активность белка апеллин. Активность белка апеллин может быть снижена или уменьшена относительно нативной активности нативного белка апеллин.

Антитела

[0079] Изобретение в общем относится к выделенным антителам к апелину, нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим эти антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и композициям, содержащим указанные антитела. Также предлагаются способы получения указанных антител, и способы применения этих антител для лечения заболеваний, включая диабетическую ретинопатию (DR) (в том числе пролиферативную диабетическую ретинопатию (PDR) и непролиферативную диабетическую ретинопатию (NPDR)), возрастную макулярную дегенерацию (AMD), диабетический макулярный отек (DME), макулярный отек после окклюзии вен сетчатки (RVO), дегенерацию сетчатки, миопическую хориоидальную неоваскуляризацию (mCNV), диабетическую нефропатию, хроническую болезнь почек (CKD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени, неоваскуляризацию бляшек, рубец радужной оболочки, неоваскулярную глаукому, неоваскуляризацию роговицы (CNV), ретинопатию недоношенных (ROP), ретинопатию, макулярную дегенерацию, синдром гиперстимуляции яичников (OHSS), маточное кровотечение, эндометриоз, гиперплазию эндометрия и рак, лейомиомы миометрия, аденомиоз, рак (например, солидные опухоли и гематологические злокачественные новообразования), фиброз (например, патологический и физиологический фиброз, фиброз почек, фиброз миокарда, фиброз печени и фиброз легких). Антитела по изобретению имеют одно или более требуемых функциональных свойств, включая, без ограничения, высокоаффинное связывание с апеллином, высокую специфичность к апелину, способность блокировать связывание апеллина с рецептором апеллина.

[0080] В общем аспекте настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с апеллином.

[0081] В контексте настоящего описания термин «антитело» используется в широком смысле и включает молекулы иммуноглобулина или антитела, включая человеческие, гуманизированные, составные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Обычно антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые проявляют специфичность

связывания к конкретному антигену. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут быть отнесены к пяти основным классам (т.е., IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG, дополнительно подразделяют на изотипы IGA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут быть любым антителом из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно антитело по изобретению представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител видов позвоночных можно отнести к одному из двух четко различимых типов, а именно каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи, полученные от крысы или человеческих антител. В дополнение к тяжелым и легким константным доменам, антитела содержат антигенсвязывающую область, которая состоит из вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е. определяющие комплементарность области 1-3 (CDR1, CDR2 и CDR3)). Домены вариабельной области легкой цепи альтернативно обозначают как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а домены вариабельной области тяжелой цепи альтернативно обозначают как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

[0082] В контексте настоящего описания термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих разными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с апелином, по существу не содержит антител, которые не связываются с апелином). Кроме того, выделенное антитело по существу не содержит других клеточных материалов и/или химических веществ.

[0083] В контексте настоящего описания термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены методом гибридомы, с помощью фагового дисплея, методом клонирования гена одного лимфоцита или методами рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного нечеловеческого животного, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющую геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и трансген легкой цепи.

[0084] В контексте настоящего описания термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями ди-

антитело (ds-антитело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), scFv-димер (двухвалентное диатело), полиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, однодоменное антитело верблюда, нанотело, доменное антитело, бивалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается родительское антитело или фрагмент родительского антитела. Согласно конкретным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи и Fd-сегмент тяжелой цепи. Согласно другим конкретным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

[0085] В контексте настоящего описания термин «одноцепочечное антитело» относится к обычному в данной области одноцепочечному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенную коротким пептидом длиной от примерно 15 до примерно 20 аминокислот. Используемый в настоящем описании термин «однодоменное антитело» относится к обычному в данной области однодоменному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

[0086] В контексте настоящего описания термин «человеческое антитело» относится к антителу, продуцируемому человеческим организмом, или антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеческим организмом, полученному с помощью любого метода, известного в данной области. Это определение человеческого антитела включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой и/или легкой цепи человека.

[0087] В контексте настоящего описания термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, не являющемуся человеческим, которое модифицировано для увеличения гомологии последовательности с последовательностью человеческого антитела с сохранением антигенсвязывающих свойств антитела, но с уменьшенной антигенностью в организме человека.

[0088] В контексте настоящего описания термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина получена из двух или более видов. Переменные области как легкой, так и тяжелой цепей часто соответствуют переменным областям антитела, полученного из одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т.д.), имеющим требуемые специфичность, сродство и характеристики, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, полученного от другого вида млекопитающего (например, человека), чтобы избежать инициации иммунного ответа у этого вида.

[0089] В контексте настоящего описания термин «полиспецифическое антитело» относится к антителу, которое содержит множество последовательностей переменного домена иммуноглобулина, причем первая последовательность переменного домена иммуноглобулина из этого множества обладает специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, а вторая последовательность переменного домена иммуноглобулина из этого множества обладает специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются или по существу не перекрываются. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например на разных белках (или разных субъединицах мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления полиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый переменный домен иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления полиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, триспецифического антитела или молекулу тетраспецифического антитела.

[0090] В контексте настоящего описания термин «биспецифическое антитело» относится к полиспецифическому антителу, которое связывается с не более чем двумя эпитопами или двумя антигенами. Биспецифическое антитело характеризуется первой последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, и второй последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например на разных белках (или разных субъединицах мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления биспецифическое антитело содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, и последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, которые имеют специфичность связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления биспецифическое антитело содержит половинное антитело или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, и половинное антитело или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления биспецифическое

антитело содержит scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, и scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления первый эпитоп расположен на апелине, а второй эпитоп расположен на VEGF, ангиопоэтин-2 (ANG-2), лейцин-богатом альфа-2-гликопротеине 1 (LRG1), PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, HER-2, EGFR, CD19, CD73, CD47, CD20, CD33, DLL3, клаудине 18.2, TIP-1, CD3, PDGF β , рецепторе коллагена типа VI, рецепторах TGF-бета, LOXL2, рецепторе нейротрофина p75 (NGFR p75) и/или рецепторе инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2R). В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к апелину или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению и анти-VEGF антитело (например, авастин (Avastin®) или биологически подобный агент бевацизумаб) или его антигенсвязывающий фрагмент конструируют для образования биспецифического антитела, которое нацелено как на апелин, так и на VEGF.

[0091] В контексте настоящего описания термин «апелин» относится к белку-предшественнику, состоящему из 77 аминокислот, называемому препроапелином, и его процессированным изоформам, которые включают апелин-13, апелин-16, апелин-17, апелин-36, апелин-55 и другие формы, происходящие из предшественника, состоящего из 77 аминокислот. Каждая изоформа обладает определенной активностью и действует как лиганд для рецептора апелина APJ (также называемого apelinR, AGTRL1 или APLNR), который является родопсин-подобным рецептором класса A, связанным с G-белком рецептором (GPCR). Изоформы апелина имеют разное сродство связывания с рецептором, что может объяснять разную эффективность инициации передачи внутриклеточных сигналов от рецептора апелина APJ. Система апелин/APJ играет важную и разнообразную роль в физиологии и патофизиологии многих органов, включая, без ограничения, регуляцию артериального давления, сократимость сердца, сердечно-сосудистый тонус, ангиогенез тканей, водный гомеостаз, физиологию желудочно-кишечного тракта, метаболический баланс, пролиферацию клеток гладких мышц сосудов (VSMC) и других типов клеток, адгезию моноцитов к эндотелиальным клеткам пупочной вены человека, восстановление сердца после инфаркта миокарда и патологический фиброз в некоторых тканях или органах. Термин «человеческий апелин» относится к апелину, полученному от человека. Пример аминокислотной последовательности предшественника человеческого апелина представлен в GenBank с номером доступа AAF25815.1 (SEQ ID NO: 221).

[0092] В контексте настоящего описания, антитело, которое «специфически связывается с апелином», относится к антителу, которое связывается с апелином, предпочтительно человеческим апелином, с $KD \times 10^{-7}$ М или менее, предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 5×10^{-10} М или менее или 1×10^{-10} М или менее. Термин «KD» относится к константе диссоциации, которую получают из отношения K_d к K_a (т.е., K_d/K_a) и выражают в виде молярной концентрации (М). Значения KD для антител могут быть определены с помощью способов, известных в данной области техники с учетом настоящего раскрытия.

Например, KD антитела можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с помощью биосенсорной системы, такой как система Biacore®, или с помощью технологии интерферометрии биослоя, например с помощью системы Octet RED96.

[0093] Чем меньше значение KD антитела, тем выше сродство связывания антитела с целевым антигеном.

[0094] Согласно конкретному аспекту изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 168, 169, 170, 171, 102 и 172, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 50, 51, 52, 110, 111 и 112, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 173, 174, 175, 176, 114 и 115, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 68, 177, 178, 128, 129 и 130, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 74, 75, 76, 134, 135 и 136, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 179, 78, 180, 137, 138 и 139, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 83, 84, 85, 143, 144 и 145, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 86, 87, 88, 146, 147 и 148, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 89, 90, 91, 149, 150 и 151, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 92, 93, 94, 152, 153 и 154, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 95, 96, 97, 155, 156 и 157, соответственно; или
- (12) SEQ ID NO: 98, 99, 100, 158, 159 и 160, соответственно;

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с апельсином, предпочтительно человеческим апельсином.

[0095] SEQ ID NO: 168 представлена аминокислотной последовательностью X_1NRX_2S , где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из S или T, и X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную из M или V.

[0096] SEQ ID NO: 169 представлена аминокислотной последовательностью $SIGSSPWX_1ASWAX_2G$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из Y или F, и X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную из Q или L.

[0097] SEQ ID NO: 170 представлена аминокислотной последовательностью $GGYRPGX_1SX_2$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из A или G, и X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную из V или I.

[0098] SEQ ID NO: 171 представлена аминокислотной последовательностью $QSSQSVYDNNDLX_1$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из A или G.

[0099] SEQ ID NO: 172 представлена аминокислотной последовательностью $AGGYX_1GDIYT$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из S или N.

[00100] SEQ ID NO: 173 представлена аминокислотной последовательностью X_1YAX_2D , где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из N или S, и X_2

представляет собой аминокислоту, выбранную из М или I.

[00101] SEQ ID NO: 174 представлена аминокислотной последовательностью VIAPNX₁X₂TX₃YPTWARG, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из R, G или H, X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из R, A или Y, и X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из Y или C.

[00102] SEQ ID NO: 175 представлена аминокислотной последовательностью YPIX₁X₂GX₃NI, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из E или D, X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из P, A, S или T, и X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из A или S.

[00103] SEQ ID NO: 176 представлена аминокислотной последовательностью QSSSVX₁X₂NNQLS, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из D или G, и X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из Y, N или M.

[00104] SEQ ID NO: 177 представлена аминокислотной последовательностью VIAPSX₁TTYYPWAKG, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из G или S.

[00105] SEQ ID NO: 178 представлена аминокислотной последовательностью YPIDPGSNX₁, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из I или V.

[00106] SEQ ID NO: 179 представлена аминокислотной последовательностью X₁X₂AMD, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из N или S, и X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из Y или H.

[00107] SEQ ID NO: 180 представлена аминокислотной последовательностью YPIDX₁GANV, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из V или A.

[00108] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную одной из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 или 39, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную одной из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 или 40. Согласно одному из предпочтительных вариантов осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно 95% идентичную SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 или 39, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно 95% идентичную SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 или 40, соответственно.

[00109] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к

полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26;

n. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 27, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28;

o. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 30;

p. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 32;

q. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 33, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34;

r. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 35, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 36;

s. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 37, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 38; или

t. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 39, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 40.

[00110] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 41, 42, 43, 101, 102 и 103, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1; и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2.

[00111] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 44, 45, 46, 104, 105 и 106,

соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 4. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4.

[00112] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 47, 48, 49, 107, 108 и 109, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 6. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6.

[00113] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 50, 51, 52, 110, 111 и 112, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 8. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8.

[00114] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту,

содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 53, 54, 55, 113, 114 и 115, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 10. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10.

[00115] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 56, 57, 58, 116, 117 и 118, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 12. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12.

[00116] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 59, 60, 61, 119, 120 и 121, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 14. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14.

[00117] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 62, 63, 64, 122, 123 и 124, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 16. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16.

[00118] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 65, 66, 67, 125, 126 и 127, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 18. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18.

[00119] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 68, 69, 70, 128, 129 и 130, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 20. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи,

имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20.

[00120] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 71, 72, 73, 131, 132 и 133, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 22. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22.

[00121] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 74, 75, 76, 134, 135 и 136, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 24. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24.

[00122] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 77, 78, 79, 137, 138 и 139, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95%

идентичную SEQ ID NO: 26. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 25; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26.

[00123] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 80, 81, 82, 140, 141 и 142, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 27, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 28. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 27; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28.

[00124] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 83, 84, 85, 143, 144 и 145, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 30. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 30.

[00125] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 86, 87, 88, 146, 147 и 148, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 31, и

вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 32. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 32.

[00126] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 89, 90, 91, 149, 150 и 151, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 34. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 33; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34.

[00127] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 92, 93, 94, 152, 153 и 154, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 35, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 36. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 35; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 36.

[00128] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 95, 96, 97, 155, 156 и 157, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи,

имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 37, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 38. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 37; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 38.

[00129] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 98, 99, 100, 158, 159 и 160, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную SEQ ID NO: 40. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 39; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 40.

[00130] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу к апельсину или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 188. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, ингибировать активность апельсина. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, специфически связываться с пиро-апельсином-13, апельсином-13, апельсином-17, апельсином-36, апельсином-55 и/или другими формами апельсина, которые имеют такой же С-терминальный конец, как и апельсин-13.

[00131] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу к апельсину или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, ингибировать активность апельсина. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, специфически связываться с апельсином-13 и/или пиро-апельсином-13.

[00132] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту,

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

[00133] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

[00134] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному гуманизированному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 211, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

b. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 212, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

c. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 213, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

d. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 214, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

e. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 213, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 216;

f. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 214, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 216;

g. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 219; или

h. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 220.

[00135] В другом общем аспекте изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Специалистам в данной области будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, путем замены, делеции, вставки и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие

фрагменты по изобретению, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков.

[00136] В другом общем аспекте изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области с учетом настоящего изобретения, такой как плазмидный, космидный, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии, такой как плазида. Вектор может включать любой элемент для обеспечения обычной функции вектора экспрессии, например, промотор, элемент связывания рибосомы, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцибельным или репресслируемым промотором. Ряд векторов экспрессии, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известны в данной области и могут быть использованы согласно изобретению для продуцирования клеткой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Для создания рекомбинантного вектора экспрессии в соответствии с вариантами осуществления изобретения могут быть использованы традиционные методы клонирования или искусственного синтеза генов.

[00137] В другом общем аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Любая клетка-хозяин, известная специалистам в данной области, может быть использована для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению с учетом настоящего раскрытия. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки *E.coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, антитела scFv или Fab), клетки CHO-DG44 или CHO-K1 или клетки HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG). Согласно конкретным вариантам осуществления рекомбинантный вектор экспрессии трансформируют в клетки-хозяева обычными способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, в которой он стабильно интегрируется в геном клетки-хозяина таким образом, чтобы обеспечивалась эффективная экспрессия рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

[00138] В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продуцирования моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с общепринятыми методами, известными в данной области техники и описанными в

настоящей заявке.

Фармацевтические композиции

[00139] В другом общем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего изобретения термин «фармацевтическая композиция» означает продукт, содержащий антитело по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела по изобретению и композиции, содержащие их, также полезны при изготовлении лекарственного средства для терапевтических применений, упомянутых в настоящем описании.

[00140] В контексте настоящего описания термин «носитель» относится к любому формообразующему агенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, липидсодержащей везикуле, микросфере, липосомальной оболочке для инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для использования в фармацевтических составах. Понятно, что характеристики носителя, формообразующего агента или разбавителя будут зависеть от пути введения, используемого для конкретного применения. Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не влияет на эффективность композиции по изобретению или биологическую активность композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, с учетом настоящего изобретения, в изобретении может быть использован любой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для использования в фармацевтической композиции антитела.

[00141] Состав фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известен в данной области, см. например, *The Science and Practice of Pharmacy* (например, 21-е издание (2005) и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, агенты, регулирующие тоничность, консерванты, стабилизаторы и хелатообразующие агенты. При приготовлении состава фармацевтических композиций по изобретению могут быть использованы один или более фармацевтически приемлемых носителей.

[00142] В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой жидкую композицию. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может содержать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т.п. Водный состав обычно содержит по меньшей мере 50% мас./мас. воды или по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или по меньшей мере 95% мас./мас. воды.

[00143] В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена в виде инъекционного раствора, который можно вводить, например, с помощью устройства для инъекции (например, шприца или инфузионного насоса).

Инъекция может быть, например, подкожной, внутримышечной, внутривенной, интравитреальной или интравенной.

[00144] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой твердый состав, например лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать как есть, или в которую врач или пациент перед использованием добавляет растворители и/или разбавители. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки и/или таблетки с покрытием и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция также может быть, например, в форме саше, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков, предназначенных для разбавления.

[00145] Лекарственные формы могут быть с немедленным высвобождением, и в этом случае они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут иметь отсроченное высвобождение, замедленное высвобождение или модифицированное высвобождение, и в этом случае они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

[00146] В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть доставлена интраназально, интробукально или сублингвально.

[00147] Значение pH водной композиции может составлять от 3 до 10. В одном из вариантов осуществления изобретения pH композиции составляет от примерно 7,0 до примерно 9,5. В другом варианте осуществления изобретения pH композиции составляет от примерно 3,0 до примерно 7,0.

[00148] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит буфер. Неограничивающие примеры буферов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бисин, цитрат, динатрия гидрофосфат, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, винную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)аминометан и их смеси. Буфер может присутствовать отдельно или в виде смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных буферов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00149] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит консервант. Неограничивающие примеры консервантов включают: бензетония хлорид, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксibenзоат, имидомочевину, метил 4-гидроксibenзоат, фенол, 2-феноксietанол, 2-фенилэтанол, пропил 4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиомеросал и их смеси. Консервант может присутствовать отдельно или в виде смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1

до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных консервантов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00150] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит регулирующий тоничность агент. Неограничивающие примеры этого варианта осуществления, включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин 1,2-пропандиол, пропиленгликоль, 1,3-пропандиол и 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, ПЭГ400) и их смеси. Другой пример регулирующего тоничность агента включает сахар. Неограничивающими примерами сахаров могут быть моно-, ди- или полисахариды или водорастворимые глюкозаны, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа- и бета-HPCD, растворимый крахмал, гидроксиэтилкрахмал и натрий карбоксиметилцеллюлозу. Другим примером регулирующего тоничность агента является сахарный спирт, причем термин «сахарный спирт» определяется как C(4-8)углеводород, имеющий по меньшей мере одну группу -ОН. Неограничивающие примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозит, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Регулирующий тоничность агент может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных регулирующих тоничность агентов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00151] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит хелатообразующий агент. Неограничивающие примеры хелатообразующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и их смеси. Хелатообразующий агент может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных хелатообразующих агентов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00152] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Неограничивающие примеры стабилизаторов включают один или более ингибиторов агрегации, один или более ингибиторов окисления, одно или более поверхностно-активных веществ и/или один или более ингибиторов протеаз.

[00153] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, причем указанный стабилизатор представляет собой карбокси/гидроксицеллюлозу и ее производные (такие как НРС, НРС-SL, НРС-L и НРМС), циклодекстрины, 2-метилтиоэтанол, полиэтиленгликоль (такой как ПЭГ 3350), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия),

серосодержащие вещества, такие как монотиоглицерин, или тиогликолевую кислоту. Стабилизатор может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00154] В других вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более поверхностно-активных веществ, предпочтительно поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два разных поверхностно-активных вещества. Термин «поверхностно-активное вещество» относится к любым молекулам или ионам, которые состоят из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано, например, из группы, состоящей из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионогенных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерионных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00155] В дополнительном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит один или более ингибиторов протеаз, таких как, например, ЭДТА, и/или солянокислый бензамидин (HCl). Ингибитор протеаз может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических ингибиторов протеаз, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00156] В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

Способы применения

[00157] В другом общем аспекте изобретение относится к способу блокирования связывания апелина с рецептором апелина у субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00158] Функциональную активность антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с апелином, можно охарактеризовать способами, известными в данной области техники и описанными в настоящей заявке. Способы определения характеристик антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с апелином, включают, без ограничения, анализы сродства и специфичности, включая анализ Biacore, ELISA и OctetRed; анализы связывания лигандов с рецепторами для детектирования блокирования связывания апелина с рецептором апелина; клеточный

анализ для определения нейтрализующей активности mAb на стимулированную апелином межклеточную передачу сигналов. Согласно конкретным вариантам осуществления способы для определения характеристик антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих апелин, включают описанные ниже методы.

[00159] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения диабетической ретинопатии (DR) у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00160] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения возрастной макулярной дегенерации (AMD) у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00161] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения диабетического макулярного отека (DME) у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00162] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения макулярного отека после окклюзии вен сетчатки (RVO) у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00163] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения дегенерации сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00164] В другом общем аспекте изобретение относится к способу миопической хориоидальной неоваскуляризации (mCNV) у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00165] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения диабетической нефропатии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00166] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения хронического заболевания почек (CKD) у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00167] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00168] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения цирроза печени у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00169] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения неоваскуляризации бляшек у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00170] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения рубцеоза радужной оболочки у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00171] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения неоваскулярной глаукомы у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00172] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения неоваскуляризации роговицы (CNV) у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00173] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения ретинопатии недоношенных (ROP) у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00174] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения ретинопатии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00175] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения макулярной дегенерации у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00176] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения синдрома гиперстимуляции яичников (OHSS) у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00177] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения маточного кровотечения у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00178] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения эндометриоза у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00179] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения гиперплазии эндометрия и рака у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00180] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения лейомиом миометрия у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00181] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения аденомиоза у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00182] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения фиброза у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению. Фиброз может быть выбран, например, из патологического и физиологического фиброза, фиброза почек, фиброза сердца, фиброза печени или фиброза легких.

[00183] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической

композиции по изобретению. Рак может представлять собой любой вид гемобластоza или солидного рака, например, рак может быть выбран из, без ограничения, рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточного рака, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, холангиокарциномы, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфобластного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других видов гемобластоza.

[00184] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит второй терапевтический противораковый агент. Второй терапевтический противораковый агент может, например, представлять собой анти-VEGF средство. Анти-VEGF средство может представлять собой, например, авастин (Avastin®) или биологически аналогичное средство бевацизумаб. Анти-VEGF средство может, например, представлять собой блокатор VEGFR1 и/или VEGFR2. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к апелину или его антигенсвязывающий фрагмент и второй терапевтический противораковый агент вводят совместно в отдельных композициях. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к апелину или его антигенсвязывающий фрагмент и второй терапевтический противораковый агент вводят совместно в одной композиции. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к апелину или его антигенсвязывающий фрагмент и второй терапевтический противораковый агент, например, анти-VEGF средство, такое как авастин (Avastin®), конструируют таким образом, чтобы они представляли собой биспецифическое антитело, которое нацелено как на VEGF, так и на апелин.

[00185] Согласно вариантам осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество антитела к апелину или его антигенсвязывающего фрагмента. В контексте настоящего описания термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает нужный биологический или лекарственный ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным способом в зависимости от заявленной цели.

[00186] Используемое в настоящем описании со ссылкой на антитела к апелину или их антигенсвязывающие фрагменты, терапевтически эффективное количество означает количество антитела к апелину или его антигенсвязывающего фрагмента, которое модулирует иммунный ответ у нуждающегося в этом субъекта. Также, используемое в настоящем описании со ссылкой на антитела к апелину или их антигенсвязывающие фрагменты, терапевтически эффективное количество означает количество антитела к апелину или его антигенсвязывающего фрагмента, которое приводит к лечению заболевания, расстройства или состояния; предотвращает или

замедляет прогрессирование заболевания, расстройства или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, расстройством или состоянием.

[00187] Согласно конкретным вариантам осуществления заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, представляет собой диабетическую ретинопатию (DR), возрастную макулярную дегенерацию (AMD), диабетический макулярный отек (DME), макулярный отек после окклюзии вен сетчатки (RVO), дегенерацию сетчатки, миопическую хориоидальную неоваскуляризацию (mCNV), диабетическую нефропатию, хроническое заболевание почек (CKD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени, неоваскуляризацию бляшек, рубеоз радужной оболочки, неоваскулярную глаукому, неоваскуляризацию роговицы (CNV), ретинопатию недоношенных (ROP), ретинопатию, макулярную дегенерацию, синдром гиперстимуляции яичников (OHSS), маточное кровотечение, эндометриоз, гиперплазию эндометрия и рак, лейомиомы миометрия, аденомиоз, фиброз (например, патологический и физиологический фиброз, фиброз почек, фиброз миокарда, фиброз печени и фиброз легких) и/или связанные с ними осложнения. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, представляет собой рак, предпочтительно рак, выбранный из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточного рака, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, холангиокарциномы, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфобластного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других видов гемобласто́за.

[00188] Согласно конкретным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству терапевтического агента, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшения или облегчения тяжести заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращения длительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iii) предотвращения прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) индуцирования регрессии заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) предотвращения развития или начала заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) предотвращения рецидива заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшения частоты госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние,

подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) уменьшения продолжительности госпитализации субъекта, страдающего от заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ix) увеличения выживаемости субъекта, страдающего от заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (xi) ингибирования или облегчения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома у субъекта; и/или (xii) усиления или улучшения профилактического или терапевтического эффекта(ов) другой терапии.

[00189] Терапевтически эффективное количество или доза может меняться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, способа введения, целевого сайта, физиологического состояния субъекта (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), от того, является ли субъект человеком или животным, других вводимых лекарственных средств, и типа лечения: является ли оно профилактическим или терапевтическим. Терапевтические дозы подбирают так, чтобы были достигнуты оптимальные уровни безопасности и эффективности.

[00190] Согласно конкретным вариантам осуществления, описанные в настоящей заявке композиции готовят в виде лекарственных форм, подходящих для предполагаемого пути введения субъекту. Например, описанные в настоящей заявке композиции могут быть приготовлены в виде лекарственной формы, подходящей для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

[00191] В контексте настоящего описания термины «лечить» и «лечение» обозначают улучшение или реверсию по меньшей мере одного измеримого физического параметра, связанного с раком, заболеванием, расстройством или состоянием диабетической ретинопатии (DR), заболеванием, расстройством или состоянием возрастной макулярной дегенерации (AMD), заболеванием, расстройством или состоянием диабетического макулярного отека (DME), заболеванием, расстройством или состоянием макулярного отека после окклюзии вен сетчатки (RVO), заболеванием, расстройством или состоянием дегенерации сетчатки, заболеванием, расстройством или состоянием миопической хориоидальной неоваскуляризации (mCNV), заболеванием, расстройством или состоянием диабетической нефропатии, заболеванием, расстройством или состоянием хронического заболевания почек (CKD), заболеванием, расстройством или состоянием неалкогольного стеатогепатита (NASH), заболеванием, расстройством или состоянием цирроза печени, заболеванием, расстройством или состоянием неоваскуляризации бляшек, заболеванием, расстройством или состоянием руброза радужной оболочки, заболеванием, расстройством или состоянием неоваскулярной глаукомы, заболеванием, расстройством или состоянием неоваскуляризации роговицы (CNV), заболеванием, расстройством или состоянием ретинопатии недоношенных (ROP), заболеванием, расстройством или состоянием ретинопатии, заболеванием, расстройством или состоянием макулярной дегенерации, заболеванием, расстройством или состоянием

синдрома гиперстимуляции яичников (OHSS), заболеванием, расстройством или состоянием маточного кровотечения, заболеванием, расстройством или состоянием эндометриоза, заболеванием, расстройством или состоянием гиперплазии эндометрия и рака, заболеванием, расстройством или состоянием лейомиом миометрия, заболеванием, расстройством или состоянием аденомиоза и/или заболеванием, расстройством или состоянием фиброза, которые не обязательно проявлены, но могут быть проявлены у субъекта. Термины «лечить» и «лечение» также могут относиться к регрессии, предотвращению прогрессированию или, по меньшей мере, замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления «лечить» и «лечение» относятся к облегчению, предотвращению развития или появления, или уменьшению продолжительности одного или более симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или состоянием, таким как опухоль или более предпочтительно рак. В конкретном варианте осуществления «лечить» и «лечение» относятся к предотвращению рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления «лечить» и «лечение» относятся к увеличению выживаемости субъекта, страдающего от заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления «лечить» и «лечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

[00192] Согласно конкретным вариантам осуществления, композицию, используемую для лечения рака, заболевания, расстройства или состояния диабетической ретинопатии (DR), заболевания, расстройства или состояния возрастной макулярной дегенерации (AMD), заболевания, расстройства или состояния диабетического макулярного отека (DME), заболевания, расстройства или состояния макулярного отека после окклюзии вен сетчатки (RVO), заболевания, расстройства или состояния дегенерации сетчатки, заболевания, расстройства или состояния миопической хориоидальной неоваскуляризации (mCNV), заболевания, расстройства или состояния диабетической нефропатии, заболевания, расстройства или состояния хронического заболевания почек (CKD), заболевания, расстройства или состояния неалкогольного стеатогепатита (NASH), заболевания, расстройства или состояния цирроза печени, заболевания, расстройства или состояния неоваскуляризации бляшек, заболевания, расстройства или состояния рубеоза радужной оболочки, заболевания, расстройства или состояния неоваскулярной глаукомы, заболевания, расстройства или состояния неоваскуляризации роговицы (CNV), заболевания, расстройства или состояния ретинопатии недоношенных (ROP), заболевания, расстройства или состояния ретинопатии, заболевания, расстройства или состояния макулярной дегенерации, заболевания, расстройства или состояния синдрома гиперстимуляции яичников (OHSS), заболевания, расстройства или состояния маточного кровотечения, заболевания, расстройства или состояния эндометриоза, заболевания, расстройства или состояния гиперплазии эндометрия и рака, заболевания, расстройства или состояния лейомиом миометрия, заболевания, расстройства или состояния аденомиоза и/или заболевания,

расстройства или состояния фиброза, можно использовать в комбинации с другим видом лечения. Для лечения рака композицию можно использовать в комбинации с другим видом лечения, включая, без ограничения, химиотерапию, терапию, которая блокирует ось VEGF/VEGFR1/VEGFR2, такую как с использованием авастина (AVASTIN®), анти-CD20 mAb, анти-CTLA-4 антитела, анти-LAG-3 mAb, анти-EGFR mAb, анти-HER-2 mAb, анти-CD19 mAb, анти-CD33 mAb, анти-CD73 mAb, анти-CD47 mAb, анти-DLL-3 mAb, mAb к апелину, анти-TIP-1 mAb, анти-CLDN18.2 mAb, анти-FOLR1 mAb, анти-PD-L1 антитела, анти-PD-1 антитела, PD-1/PD-L1 терапию или другие иммуноонкологические препараты, таргетную терапию, антиангиогенное средство, лучевую терапию или другие противоопухолевые препараты. Антитела к апелину могут быть использованы для конструирования биспецифических антител с mAb-партнерами к VEGF, ангиопоэтину-2 (ANG-2), богатому лейцином альфа-2-гликопротеину 1 (LRG1), CD73, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD47, DLL3, клаудину 18.2, TIP-1, CD3, PDGF β , рецептору коллагена типа VI, рецепторам TGF-бета, LOXL2, рецептору нейротрофина p75 (NGFR p75), рецептору инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2R) и/или другими mAb к поверхностным опухолевым антигенам для лечения рака/опухолей. Для лечения диабетической ретинопатии (DR), возрастной макулярной дегенерации (AMD) и/или диабетического макулярного отека (DME) композицию можно использовать в комбинации с другим терапевтическим агентом, включающим, без ограничения, блокатор VEGF (например, ранибизумаб (LUCENTIS®), афлиберцепт (EYLEA®, конберцепт) или другое лекарственное средство против DR, AMD и/или DME. Антитела к апелину можно использовать для конструирования биспецифических антител с mAb-партнерами к VEGF, ANG-2 и/или другими mAb к антигенам, специфическим по отношению к DR, AMD и/или DME, для лечения DR, AMD и/или DME, которые экспрессируют как апелин, так и антиген, специфический по отношению к DR, AMD и/или DME.

[00193] Используемый в настоящем описании термин «в комбинации» в контексте введения субъекту двух или более терапевтических агентов относится к применению более чем одного вида терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок введения терапевтических агентов субъекту. Например, первый терапевтический агент (например, описанную в настоящей заявке композицию) можно вводить до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 часа, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часов, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения субъекту второго терапевтического агента.

[00194] В другом общем аспекте изобретение относится к способу определения уровня апелина у субъекта. Способ включает (a) получение образца от субъекта; (b)

приведение образца в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (с) определение уровня апелина у субъекта. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец ткани или крови. Образец ткани может представлять собой, например, образец раковой ткани. Образец крови может содержать, например, раковые клетки.

[00195] В контексте настоящего описания «образец» относится к биологическому образцу, полученному от субъекта, и может включать, без ограничения, цельную кровь, сыворотку, плазму, клетки крови, эндотелиальные клетки, биопсию ткани (например, раковую ткань, ткань печени и т.д.), лимфатическую жидкость, асцитную жидкость, интерстициальную жидкость, костный мозг, спинномозговую жидкость, слюну, слезистую, мокроту, пот, мочу или любые другие выделения, экскрецию или другие жидкости организма. «Образец крови» относится к цельной крови или любой ее фракции, включая клетки крови, сыворотку и плазму. «Образец крови» может, например, содержать раковые клетки.

[00196] В некоторых вариантах осуществления уровень апелина у субъекта может быть определен с помощью анализов, выбранных, без ограничения, из вестерн-блот анализа, анализа ELISA и/или радиоиммунологического анализа (RIA). Относительные уровни белка могут быть определены с помощью вестерн-блот анализа и иммуногистохимии (ИНС), а абсолютные уровни белка могут быть определены с помощью анализа ELISA или анализа RIA. При определении относительных уровней апелина уровни апелина могут быть определены по меньшей мере между двумя образцами, например, между образцами, полученными от одного и того же субъекта в разные моменты времени, между образцами, полученными из разных тканей одного и того же субъекта, и/или между образцами, полученными от разных субъектов. Альтернативно, при определении абсолютных уровней апелина, например с помощью анализа ELISA, абсолютный уровень апелина в образце может быть определен путем создания перед тестированием образца стандарта для анализа ELISA, а случае использования анализа RIA абсолютный уровень апелина в образце может быть определен путем смешивания образца с меченым радиоактивным изотопом апелином и известным количеством антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению, позволяя им связываться, отделения связанного апелина (включая радиоактивный и нативный) от свободного (несвязанного) (включая радиоактивный и нативный) и измерения радиоактивности свободного (несвязанного) апелина. Специалист в данной области поймет, какие аналитические методы использовать для определения уровня апелина в полученном от субъекта образце с помощью антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

[00197] Использование способов определения уровня апелина в образце от субъекта позволяет диагностировать аномальные (повышенные, пониженные или недостаточные) уровни апелина при заболевании и принятию соответствующих решений относительно терапии. Такое заболевание может быть выбрано, без ограничения, из сердечно-сосудистого заболевания, сердечной недостаточности, диабета, ожирения,

диабетической ретинопатии (DR), возрастной макулярной дегенерация (AMD), диабетического макулярного отека (DME), макулярного отека после окклюзии вен сетчатки (RVO), дегенерации сетчатки, миопической хориоидальной неоваскуляризации (mCNV), диабетической нефропатии, хронического заболевания почек (CKD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), цирроза печени, неоваскуляризации бляшек, рубеоза радужной оболочки, неоваскулярной глаукомы, неоваскуляризации роговицы (CNV), ретинопатии недоношенных (ROP), ретинопатии, макулярной дегенерации, синдрома гиперстимуляции яичников (OHSS), маточного кровотечения, эндометриоза, гиперплазии эндометрия и рака, лейомиом миометрия, аденомиоза, фиброза (например, патологического и физиологического фиброза, фиброза почек, фиброза сердца, фиброза печени и фиброза легких) и/или рака. Кроме того, путем мониторинга уровней апелина у субъекта риск развития указанного выше заболевания может быть определен на основе знания уровня апелина при конкретном заболевании и/или во время прогрессирования конкретного болезни.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00198] Изобретение также предусматривает следующие неограничивающие варианты осуществления.

[00199] Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности

- (1) SEQ ID NO: 168, 169, 170, 171, 102 и 172, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 50, 51, 52, 110, 111 и 112, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 173, 174, 175, 176, 114 и 115, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 68, 177, 178, 128, 129 и 130, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 74, 75, 76, 134, 135 и 136, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 179, 78, 180, 137, 138 и 139, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 83, 84, 85, 143, 144 и 145, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 86, 87, 88, 146, 147 и 148, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 89, 90, 91, 149, 150 и 151, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 92, 93, 94, 152, 153 и 154, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 95, 96, 97, 155, 156 и 157, соответственно; или
- (12) SEQ ID NO: 98, 99, 100, 158, 159 и 160, соответственно;

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с апелином, предпочтительно человеческим апелином.

[00200] Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27,

29, 31, 33, 35, 37 или 39, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 или 40.

[00201] Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, содержащее:

(a) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(b) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4;

(c) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6;

(d) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;

(e) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;

(f) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;

(g) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;

(h) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16;

(i) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;

(j) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20;

(k) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22;

(l) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24;

(m) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 25, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26;

(n) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 27, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28;

(o) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 30;

(p) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 32;

(q) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 33, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34;

(r) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 35, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 36;

(s) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 37, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 38; или

(t) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 40.

[00202] Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное моноклональное антитело к апелину или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 188.

[00203] Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное моноклональное антитело к апелину или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204.

[00204] Вариант осуществления 6 представляет собой изолированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 4 или 5, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активность апелина.

[00205] Вариант осуществления 7 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 4, причем

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с пиро-апелином-13, апелином-13, апелином-17, апелином-36, апелином-55 и/или другими формами апелина, которые имеют такой же С-терминальный конец, как и апелин-13.

[00206] Вариант осуществления 8 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 5, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с апелином-13 и/или пиро-апелином-13.

[00207] Вариант осуществления 9 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-8, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

[00208] Вариант осуществления 10 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

[00209] Вариант осуществления 11 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент варианта осуществления 10, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 211, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

b. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 212, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

c. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 213, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

d. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 214, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

e. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 213, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 216;

f. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 214, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 216;

g. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 219; или

h. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218, и переменную область легкой цепи, имеющую

полипептидную последовательность SEQ ID NO: 220.

[00210] Вариант осуществления 12 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11.

[00211] Вариант осуществления 13 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 12.

[00212] Вариант осуществления 14 представляет собой клетку-хозяин, содержащую вектор по варианту осуществления 13.

[00213] Вариант осуществления 15 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

[00214] Вариант осуществления 16 представляет собой способ блокирования связывания апелина с рецептором апелина у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00215] Вариант 17 осуществления представляет собой способ лечения диабетической ретинопатии (DR) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00216] Вариант осуществления 18 представляет собой способ лечения возрастной макулярной дегенерации (AMD) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00217] Вариант осуществления 19 представляет собой способ лечения диабетического макулярного отека (DME) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00218] Вариант 20 осуществления представляет собой способ лечения макулярного отека после окклюзии вен сетчатки (RVO) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00219] Вариант осуществления 21 представляет собой способ лечения дегенерации сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00220] Вариант осуществления 22 представляет собой способ лечения миопической хориоидальной неоваскуляризации (mCNV) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00221] Вариант осуществления 23 представляет собой способ лечения диабетической нефропатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00222] Вариант осуществления 24 представляет собой способ лечения хронического заболевания почек (CKD) у нуждающегося в этом субъекта, включающий

введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00223] Вариант осуществления 25 представляет собой способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00224] Вариант осуществления 26 представляет собой способ лечения цирроза печени у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00225] Вариант 27 осуществления представляет собой способ лечения неоваскуляризации бляшек у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00226] Вариант осуществления 28 представляет собой способ лечения рубеоза радужной оболочки у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00227] Вариант 29 осуществления представляет собой способ лечения неоваскулярной глаукомы у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00228] Вариант 30 осуществления представляет собой способ лечения неоваскуляризации роговицы (CNV) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00229] Вариант 31 осуществления представляет собой способ лечения ретинопатии недоношенных (ROP) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00230] Вариант 32 осуществления представляет собой способ лечения ретинопатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00231] Вариант 33 осуществления представляет собой способ лечения макулярной дегенерации у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00232] Вариант 34 осуществления представляет собой способ лечения синдрома гиперстимуляции яичников (OHSS) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00233] Вариант 35 осуществления представляет собой способ лечения маточного кровотечения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00234] Вариант 36 осуществления представляет собой способ лечения эндометриоза у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00235] Вариант 37 осуществления представляет собой способ лечения гиперплазии эндометрия и рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00236] Вариант осуществления 38 представляет собой способ лечения лейомиометрия у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00237] Вариант осуществления 39 представляет собой способ лечения аденомиоза у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00238] Вариант осуществления 40 представляет собой способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00239] Вариант осуществления 41 представляет собой способ по варианту осуществления 40, причем фармацевтическая композиция дополнительно содержит второй противораковый агент.

[00240] Вариант осуществления 42 представляет собой способ по варианту осуществления 41, причем второй противораковый агент представляет собой анти-VEGF средство.

[00241] Вариант осуществления 43 представляет собой способ по варианту осуществления 42, причем анти-VEGF средство представляет собой авастин (AVASTIN®) или биологически аналогичное средство бевацизумаб.

[00242] Вариант осуществления 44 представляет собой способ по варианту осуществления 42, причем анти-VEGF средство представляет собой блокатор VEGFR1 и/или VEGFR2.

[00243] Вариант осуществления 45 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 40-44, причем рак выбирают из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточного рака, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, холангиокарциномы, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфобластного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других видов гемобластома.

[00244] Вариант осуществления 46 представляет собой способ по варианту осуществления 45, причем рак представляет собой холангиокарциному.

[00245] Вариант осуществления 47 представляет собой способ лечения фиброза ткани у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00246] Вариант осуществления 48 представляет собой способ определения уровня апелина у субъекта, включающий (a) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления 1-11; и (c) определение уровня апелина у субъекта.

[00247] Вариант осуществления 49 представляет собой способ по варианту осуществления 48, в котором образец представляет собой образец ткани.

[00248] Вариант осуществления 50 представляет собой способ по варианту осуществления 49, в котором образец ткани представляет собой образец раковой ткани.

[00249] Вариант осуществления 51 представляет собой способ по варианту осуществления 49, в котором образец ткани представляет собой образец ткани печени.

[00250] Вариант осуществления 52 представляет собой способ по варианту осуществления 49, в котором образец ткани представляет собой образец ткани почки.

[00251] Вариант осуществления 51 представляет собой способ получения моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-11, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продуцирования моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

[00252] Вариант осуществления 54 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11, включающий объединение моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

ПРИМЕРЫ

[00253] Пример 1: Идентификация моноклональных антител к апелину

[00254] Кроликов иммунизировали цис-апелином-17 (с цистеином, добавленным на N-конце; C-KFRRQRPRLSHKGMPF (SEQ ID NO: 161)) и пир-апелином-13-Cys (пироглутамилированная форма апелина-13 с цистеином, добавленным на C-конце; пептиды pE-RPRLSHKGMPF-C (SEQ ID NO: 162)), конъюгированным с белком-носителем KLH. Для получения кроличьих mAb выделяли PBMC из цельной крови иммунизированных кроликов, и антиген-специфические В-клетки выращивали в 96-луночных планшетах. В-клетки, секретирующие реактивные антитела к пир-апелину-13 (пироглутамилированной форме апелина-13; pE-RPRLSHKGMPF (SEQ ID NO: 163)) идентифицировали скринингом супернатантов культуры В-клеток методом ELISA на антигенсвязывающие молекулы. Планшеты для ELISA с высоким связыванием покрывали пир-апелином-13 в карбонатном буфере для покрытия (pH 9,6) с концентрацией 1 мкг/мл и оставляли на ночь. После того как планшеты блокировали 1% BSA в TBS, добавляли разбавленные супернатанты В-клеточной культуры (разведение от 1 до 10), и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 90 минут. После связывания кроличьих антител с пир-апелином-13 добавляли козье Fc-специфическое антитело к IgG, конъюгированное с щелочной фосфатазой, и связывание антитело-антиген определяли путем добавления субстрата PNPP и считывания оптической плотности в планшетах для ELISA при 405 нм.

Связывание кроличьих антител с пир-апелином-13 дополнительно подтверждали дифференциальным связыванием антител с пептидами: пир-апелин-13-Cys (pE-RPRLSHKGPMPF-C (SEQ ID NO: 162)), Cys-(Q)апелин-13 (CQRPRLSHKGPMPF (SEQ ID NO: 164)) и Cys-апелин-17 (CKFRRQRPRLSHKGPMPF (SEQ ID NO: 161)). Для клонирования кроличьих моноклональных антител к апелину-13 кДНК кроличьего IgG получали из общей РНК, полученной из идентифицированных В-клеток, амплифицировали с помощью ПЦР и затем клонировали в вектор экспрессии.

[00255] Вариабельные области тяжелой и легкой цепей секвенировали. Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей mAb к апелину приведены в таблице 1 и таблице 2, соответственно. Последовательности CDR тяжелой и легкой цепей этих mAb приведены в таблице 3 и таблице 4, соответственно. CDR тяжелой и легкой цепей mAb к апелину определяли с помощью метода Кабат.

Таблица 1: Последовательности вариабельных областей тяжелой цепи моноклональных антител (mAb) к апелину

Клоны mAb	VH
C8	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWIGS IGSSPWYASWAQGRFTISKTSSTTVNLKITSPTTEDTATYFCAKGGYRPG ASVWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)
C24	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLYTNRVSWVRQAPGKGLDWIGSI GSSPWYASWAQGRFTISKTSSTTVNLKITSSTTEDTATYFCAKGGYRPGG SIWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO:3)
C25	QSLEESGGGLVTPGTPLTLTCTVSGIDLYTNRMSWVRQAPGKGLEWIGS IGSSPWFASWALGRFTISKTSSTTVNLKITSPTTEDTATYFCAKGGYRPGA SVWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO:5)
C7	QSLEESGGRLAKPDETLTLTCTVSGIDLNSHAMDWVRQAPGKGLEWIG VIAPDTRTYATWARGRFTISKTSSTSVELKMTSLTTEDTATYFCAAYPI EPGANIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:7)
C6	QSLEESGGRLVKPDETLTLTCTVSGIDLSNYAMDWVRQAPGKGLEWIG VIAPNRRTYPTWARGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCATYPI EPGANIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:9)
C1	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGFSLSSYAMDWVRQAPGKGLEWIG VIAPNGATYYPTWARGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTAADTATYFCATYPI DAGANIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:11)
C16	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLNSYAMDWVRQAPGKGLEWIG VIAPNHYTYPTWARGRFTISKTSSTTVDLKMTRLTTEDTATYFCATYPIE SGSNIWGPGLTVIVSS (SEQ ID NO:13)
C20	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLNNYAIDWVRQAPGKGLEWIGV IAPNHYTCYPTWARGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCAAYPIET GSNIWGPGLTVIVSS (SEQ ID NO:15)
C22	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLNNYAMDWVRQAPGKGLEWIG VIAPNHYTYPTWARGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCATYPIE TGSNIWGPGLTVIVSS (SEQ ID NO:17)
C10	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLNSYAIDWVRQAPGKGLEWIGVI APSGTTYPTWAKGRFTISKTSSTTVDLKVTGLTTEDTATYFCAAYPIDPG SNIWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO:19)
C12	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLSSYAIDWVRQAPGKGLEWIGVI APSSTTYPTWAKGRFTISKTSSTTVDLKVIGLTTEDTATYFCAAYPIDP

	GSNVWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:21)
C13	QSLEESGGRLAKPGETLTLTCTVSGIDLNSHAVDWVRQAPGKGLEWIGV IGPGGNTYYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTAEDTATFFCATYPIY SGDNIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:23)
C14	QSPEESGGRLVTPGGSLTLTCKISGVDLSNYAMDWVRQAPGKGLEWIG VIAPNDATYYPTWARGRLTISKTSSTTVDLKMTRLTTEDTATYFCAAYPI DVGANVWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:25)
C11	QSLEESGGRLVSPGGSLTLTCTVSGIDLSSHAMDWVRQAPGKGLEWIGV IAPNDATYYPTWARGRFTISKTSSTTVGLKMTRLTTEDTATYFCAAYPID AGANVWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:27)
C4	QEQLQSGGGAEGGLVKPGGSLELCKASGFTLSSSYWICWVRQAPGK GLEWIGCIHYGSSGTAYYASWVNGRFTLSRDIDQSTGCLQLNSLTAADT AMYYCARFLSDMYYYNLWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:29)
C5	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSGAWMNWVRQAPGKGLEWIG VVSSDDNIYYADWAKGRFTISKTSSTTVDLKLTSPTTEDTATYFCARNLG TIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:31)
C9	QEQLQSGGDLVKPEGSLLTLTCTASGFSFSSSYWICWVRQAPGKGLEWI ACIQSGDGRTWYASWAEGRFTISKTSPTTVTLQMASLTAADTATYFC ARCPHNTYSHFDLWGPSTLTVTVSS (SEQ ID NO:33)
C26	QEQLQSGGGLVQPEGSLLTLTCTASGFTLSNYWMSWVRQAPGKGLVWI GCIDIGSDDTYASWAKGRFTISRTSSTTVTLQVTSLTAADTATYFCARS GGLWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:35)
C27	QSVEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLINAWMNWVRQAPGKGLEWIG TTTDDDTIYYANWAKGRFTISRTSSTTVDLKVTSLSLSEDATYFCCKGRIW GPGTLTVTVSL (SEQ ID NO:37)
C17	QSVEESGGRLVKPDETLTLTCAVSGIDLSSNAMNWVRQAPGEGLEWIGS MYTDGTTYYANWAKGRFTISRASSTTVDLKMTSLTAADTATYFCARGD IWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:39)

VH: переменная область тяжелой цепи

Таблица 2: Последовательности переменных областей легкой цепи моноклональных mAb к аполину

Клоны mAb	VL
C8	QVLTQTESPVSAVGGTVTIACQSSQSVYDNNDLAWYQQKAGQTPKRL IYLASSLD SGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECDAAATYYCAGGYSGDIY TFGGGTEVVVE (SEQ ID NO:2)
C24	QVLTQSASPVSAAVGDSVTIACQSSQSVYDNNDLGWYQQKPGQTPKRL IYLASSLD SGVPSRFSGSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYCAGGYSGDIY TFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:4)
C25	QVLTQTESPVSAVGGTVTIACQSSQSVYDNNDLAWYQQKAGQTPKRL IFLASSLD SGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECDAAATYYCAGGYNGDIY TFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:6)
C7	DPVLTQTPSPVSAVGGTVTIGCQASESDYNNQLSWYQQKPGQAPKR LMYYVSTLD SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYCQGGYPYN IYPFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:8)
C6	DPVLTQTPSPVSAVGGTVTIGCQSSESVDYNNQLSWYQQKPGQPPKRL MYYVSTLD SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYCQGGYISNIY PFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:10)
C1	DPVLTQTPSSVSAVGGTVTIGCQSSESVDNNNQLSWYQQKSGQPPKRL MYYVSTLD SGVPSRFKSGSGTHFTLTISGVQCYDAATYYCQGGYISNL YPFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:12)

C16	DPVLTQTPSSVSAAVGGT VTIGCQSSSVGMNNQLSWYQQKPGQPPKRL LMYYVSTLDSGVPSRFRKSGSGTQFSLTISDLECDAGTYYCQGGYISN LYPFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:14)
C20	DPMLTQTPSSVSAAVGGT VTISCQSSSVDMNNQLSWYQQKPGQPPKRL LMYYVSTLDSGVPSRFRKSGSGSIHFSLTISDLECADAGTYYCQGGYISNL YPFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:16)
C22	DPVLTQTPSSVSAAVGGT VTISCQSSSVDMNNQLSWYHQKSGQPPKRL MYYVSTLDSGVPSRFRKSGSGTQFTLTISGVQCDDAGTYYCQGGYISNL YPFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:18)
C10	DPVLTQTPSSVSAAVGGT ATIGCQSSSVDYGNQLSWYQQKPGQPPKRL AYYVSILDAGVPSRFRKSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYCQGGYISNLY PFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:20)
C12	DPVLTQTPSSVSAAVGGT VTIGCQSSSVDYGNQLSWYQQKPGQPPKRL TYYVSILDAGVPSRFRKSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYCQGGYISNLY PFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:22)
C13	DPVLTQTPSSVSAAVGGT VTINCQSSSVDNNNQLSWYQQKVGQPPKRL LMYYASTLDSGVPSRFRKGGSGTHFTLTITDLECDAAATYYCQGGTAT NIYPFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:24)
C14	DPMLTQTASPVSAAVGGT VTINCQSSSVDYNNQLSWYQQKPGQPPKRL LMYYVSTLDSGVPSRFRKSGSGTQFSLTISDLECDAGTYYCQGGYISN LYPFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:26)
C11	DPMLTQTASPVSAHVGGT VTINCQSSSVDYNNQLSWYQQKPGQPPKRL LMYYVSTLDSGVPSRFRKSGSGTQFSLTISDLECDAGTYYCQGGYISN LYPFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:28)
C4	QVLTQTPASVSAAVGGT VTINCQASQSIYNNNNQLSWYQQKPGQPPKLLI YYASTLASGVSSRFRKSGSGTQFTLTISGVQCDDAAATYYCQGQFNCRSA DCHAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:30)
C5	QVLTQTESPVSAAVGGT VTINCQSSQSVWSNYLSWFQQKPGQPPKVLII GTSKLPSPVPSRFRSGSGSGTEFTLTINDLECDAAATYYCAGGYSGHIYSF GGGTEVVVK (SEQ ID NO:32)
C9	ADIVMTQTPASVEAAVGGT VTIKCQASQSINSWLSWYQQKPGQPPKPLI YGASNLASGVPSRFRKSGSGTQFTLTISDLECADAAATYSCLGYYYSSYN SVGFWAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:34)
C26	QVLTQTPSSTSAAVGGT VTINCQASQSVYNNNDLAWYQQKPGQPPKRL IYEASKLASGVPSRFRSGSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYCAGGWSGNF YVFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:36)
C27	QVLTQTPASVSAAVGGT VTINCQASQSVYDGNWLCWYQQKPGQPPKRL LIYKASTLESVPSRFRKSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYCQGGFTSNI YPFAGGTEVVVK (SEQ ID NO:38)
C17	QVLTQTASPVSAAVGGT VTISCQSSQSVYNNNNWLAWFQQKPGQPPKRL IYGTSELASGVPSRFRKSGSGTQFTLTISGVQCDDAAATYYCLGTYSNNIH VFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:40)

VL: переменная область легкой цепи

Таблица 3: CDR области 1-3 тяжелой цепи mAb к апельину

Клоны mAb	HC		
	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
C8	SNRMS (41)	SIGSSPWYASWAQG (42)	GGYRPGASV (43)
C24	TNRVS (44)	SIGSSPWYASWAQG (45)	GGYRPGGSI (46)
C25	TNRMS (47)	SIGSSPWFASWALG (48)	GGYRPGASV (49)
C7	SHAMD (50)	VIAPDTRTYATWARG (51)	YPIEPGANI (52)
C6	NYAMD (53)	VIAPNRRTYYPTWARG (54)	YPIEPGANI (55)

C1	SYAMD (56)	VIAPNGATYYPTWARG (57)	YPIDAGANI (58)
C16	SYAMD (59)	VIAPNHYYTYPTWARG (60)	YPIESGSNI (61)
C20	NYAID (62)	VIAPNHYYTCYPTWARG (63)	YPIETGSNI (64)
C22	NYAMD (65)	VIAPNHYYTYPTWARG (66)	YPIETGSNI (67)
C10	SYAID (68)	VIAPSGTTYPTWAKG (69)	YPIDPGSNI (70)
C12	SYAID (71)	VIAPSTTTYPTWAKG (72)	YPIDPGSNV (73)
C13	SHAVD (74)	VIGPGGNTYYASWAKG (75)	YPIYSGDNI (76)
C14	NYAMD (77)	VIAPNDATYYPTWARG (78)	YPIDVGANV (79)
C11	SHAMD (80)	VIAPNDATYYPTWARG (81)	YPIDAGANV (82)
C4	SSYWIC (83)	CIHYGSSGTAYYASWVNG (84)	FLSDMYYYNL (85)
C5	GAWMN (86)	VVSSDDNIYYADWAKG (87)	NLGTI (88)
C9	SSYWIC (89)	CIYQSGDGRTWYASWAEG (90)	CPHNTYSHFDL (91)
C26	NYWMS (92)	CIDIGSDDTYASWAKG (93)	SGGL (94)
C27	NAWMN (95)	TTTDDDDTIYYANWAKG (96)	GRI (97)
C17	SNAMN (98)	SMYTDGTTYANWAKG (99)	GDI (100)

HC: тяжелая цепь; CDR: определяющая комплементарность область

CDR HC mAb к апельину определяли с помощью метода IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 4: CDR области 1-3 легкой цепи mAb к апельину

Клоны mAb	LC		
	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
C8	QSSQSVYDNNDLA (101)	LASSLDS (102)	AGGYSGDIYT (103)
C24	QSSQSVYDNNDLG (104)	LASSLDS (105)	AGGYSGDIYT (106)
C25	QSSQSVYDNNDLA (107)	LASSLDS (108)	AGGYNGDIYT (109)
C7	QASESDYNNQLS (110)	YVSTLDS (111)	QGGYPYNIYP (112)
C6	QSSQSVYDNNQLS (113)	YVSTLDS (114)	QGGYISNIYP (115)
C1	QSSQSVYDNNQLS (116)	YVSTLDS (117)	QGGYISNLYP (118)
C16	QSSQSVGMNNQLS (119)	YVSTLDS (120)	QGGYISNLYP (121)
C20	QSSQSVDMNNQLS (122)	YVSTLDS (123)	QGGYISNLYP (124)
C22	QSSQSVDMNNQLS (125)	YVSTLDS (126)	QGGYISNLYP (127)
C10	QSSQSVYDGNQLS (128)	YVSILDA (129)	QGGYISNLYP (130)
C12	QSSQSVYDGNQLS (131)	YVSILDA (132)	QGGYISNLYP (133)
C13	QSSQSVYDNNQLS (134)	YASTLDS (135)	QGGTATNIYP (136)
C14	QSSQSVYDNNQLS (137)	YVSTLDS (138)	QGGYISNLYP (139)
C11	QSSQSVYDNNQLS (140)	YVSTLDS (141)	QGGYISNLYP (142)
C4	QASQSIYNNNNQLS (143)	YASTLAS (144)	QGGFNCRSADCHA (145)
C5	QSSQSVWSNYLS (146)	GTSKLPS (147)	AGGYSGHIYS (148)
C9	QASQSINSWLS (149)	GASNLAS (150)	LGYYYSSYNSVGFVA (151)
C26	QASQSVYNNNDLA (152)	EASKLAS (153)	AGGWSGNFYV (154)
C27	QASQSVYDGNWLC (155)	KASTLES (156)	QGGFTSNIYP (157)
C17	QSSQSVYNNNNWLA (158)	GTSELAS (159)	LGTYSSNIHV (160)

LC: легкая цепь; CDR: определяющая комплементарность область

CDR LC mAb к апельину определяли с помощью метода IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

[00256] **Получение и очистка рекомбинантных mAb**

[00257] Для получения рекомбинантных кроличьих mAb к апелину осуществляли временную трансфекцию клеток HEK293 векторами экспрессии, содержащими кДНК кроличьих IgG. Рекомбинантные антитела получали в суспензии клеток HEK293 и очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А.

[00258] **Пример 3: Оценка специфического связывания mAb к апелину с пептидами апелина**

[00259] Специфическое связывание рекомбинантных кроличьих mAb с апелिनсом подтверждали с помощью ELISA с использованием следующих биотинилированных пептидов апелина: биотин-апелин-13 (биотин-QRPRLSHKGMPF (SEQ ID NO: 165)), апелин-13-биотин (QRPRLSHKGMPF-биотин (SEQ ID NO: 165)), пир-апелин-13-биотин (pE-RPRLSHKGMPF-биотин (SEQ ID NO: 163)), биотин-апелин-17 (биотин-KFRRQRPRLSHKGMPF (SEQ ID NO: 166)), апелин-17-биотин (KFRRQRPRLSHKGMPF-биотин (SEQ ID NO: 166)) и биотин-апелин-(27-14) (биотин-GPGAWQGGRRKFRF (SEQ ID NO: 167)). Для анализа связывания нейтравидин в карбонатном буфере для покрытия наносили на планшеты для ELISA с высокой степенью связывания с концентрацией 1 мкг/мл и оставляли на ночь. Пептиды добавляли в концентрации 4 мкг/мл после того, как планшеты блокировали 1% BSA в TBS. После инкубации планшетов при комнатной температуре в течение 60 минут планшеты промывали, и затем добавляли очищенные рекомбинантные кроличьи антитела в концентрации 200 нг/мл. После связывания кроличьих антител с пептидами на планшетах при комнатной температуре в течение 90 минут добавляли козье Fc-специфическое антитело к IgG, конъюгированное с щелочной фосфатазой, и связывание антитело-антиген определяли путем добавления субстрата PNPP и считывания поглощения планшетов для ELISA при 405 нм. Каждое mAb анализировали в двух экземплярах. Связывание mAb к апелину с пептидами апелина показано на фиг. 1А-С (биотин-APL13, биотин-апелин-13; APL13-биотин, апелин-13-биотин; пирAP13-биотин, пир-апелин-13-биотин; биотин-APL17, биотин-апелин-17; APL17-биотин, апелин-17-биотин; биотин-APL27-14, биотин-апелин-(27-14)). На связывание апелина некоторыми mAb, как показано на фиг. 1А, влияет биотинилирование С-конца пептидов апелина, что позволяет предположить, что С-конец апелина важен для связывания апелина с этими mAb. На связывание апелина некоторыми mAb, как показано на фиг. 1В, влияет биотинилирование N-конца апелина-13. Показанные на фиг. 1С mAb имеют профили связывания, отличающиеся от профилей на фиг. 1А и 1В.

[00260] **Пример 4: Клеточный анализ для оценки нейтрализующего действия mAb к апелину**

[00261] Анализ cAMP HitHunter® выполняли с использованием клеточной линии cAMP Hunter™ CHO-K1 AGTRL1 Gi (# 95-0147C2) (DiscoverX; Fremont, CA; США). Клетки высевали в 384-луночные белые обработанные планшеты для культур тканей (Corning # 3570) (Corning; Corning, NY; США) с плотностью 10000 клеток/лунку и

инкубировали при 37°C в течение ночи. Затем клетки трижды промывали бессывороточной средой, после чего инкубировали при 37°C в течение 5 минут со смесью апелин/mAb, которую предварительно инкубировали при 37°C в течение 15 минут. На этом этапе конечная концентрация апелина, инкубированного с клетками, составляла 1,2 нМ. Форсколин (FSK) добавляли в каждую лунку так, чтобы конечная концентрация FSK составляла 15 мкМ, а конечная концентрация апелина составляла 1 нМ. После инкубации в течение 30 минут уровень цАМФ измеряли с помощью набора для анализа cAMP H1THUNTER® для биологических препаратов (DiscoverX # 90-0075LM10) в соответствии с протоколом производителя. Хемилюминесцентный сигнал считывали на планшетном ридере EnVision (384 US Lum) (Perkin Elmer; Waltham, MA; США). Каждое mAb при заданном разведении анализировали трижды. Для расчета % ингибирования mAb при заданной концентрации 0% ингибирования определяли как сигнал, поступающий от FSK-стимулированных клеток при обработке апелином, а 100% ингибирования определяли как сигнал, поступающий от FSK-стимулированных клеток без обработки апелином. Нейтрализующие эффекты отдельных mAb к апелину показаны на фиг. 2А-К.

[00262] Пример 5: Анализ сродства mAb к апелину

[00263] Для определения KD для клонов mAb C4, C5, C8, C9, C17, C24, C25, C26 и C27 на поверхности CM5-SA (стрептавидин) чипа (GE Lifesciences; Marlborough, MA) иммобилизовали биотин-апелин-13 (биотин-QRPRLSHKGPMPPF (SEQ ID NO: 165)). mAb к апелину в четырех различных концентрациях (12,5 нМ, 25 нМ, 50 нМ и 100 нМ) захватывали на поверхности чипа. Измеряли скорость ассоциации и диссоциации для связывания антитело-антиген, аппроксимировали и строили кривую. Данные приведены в таблице 5.

[00264] Для определения KD для клонов mAb C1, C6, C7, C10, C11, C12, C14, C16, C20 и C22, в описанном выше анализе Biacore использовали апелин-13-биотин (QRPRLSHKGPMPPF-биотин (SEQ ID NO: 165)) и пир-апелин-13-биотин (pE-RPRLSHKGPMPPF-биотин (SEQ ID NO: 163)). Данные приведены в таблице 6.

Таблица 5: Значения KD для mAb к апелину по результатам анализа Biacore

Клоны mAb	KD
C4	4,01 нМ
C5	51,3 нМ
C8	17,4 пМ
C9	14,8 нМ
C17	1,06 нМ
C24	0,401 пМ
C25	50,8 пМ
C26	119 пМ
C27	589 пМ

Таблица 6: Значения KD для mAb к апелину, измеренные с использованием апелина-13 и пиро-апелина-13 в анализе Biacore

mAb clones	KD	
	Апелин-13	Пиро-апелин-13
C1	48,9 пМ	0,154 пМ
C6	5,96 пМ	0,513 пМ
C7	3,14 пМ	0,326 пМ
C10	6,46 пМ	0,0482 пМ
C11	39,3 пМ	0,141 пМ
C12	3,55 пМ	0,0555 пМ
C14	141 пМ	6,49 пМ
C16	14,3 нМ	6,14 нМ
C20	202 пМ	41,9 пМ
C22	107 пМ	0,155 пМ

Пример 6: Картирование эпитопа для mAb к апелину

[00265] Сайты связывания антител для mAb к апелину C8, C24 и C25 картировали с помощью конкурентного анализа ELISA, используя конкурентные пептиды. Вкратце, mAb захватывали на планшете для ELISA и измеряли связывание биотин-апелин-13 (SEQ ID NO: 165) с mAb. Каждый из конкурентных пептидов (таблица 7) оценивали по его способности ингибировать связывание биотин-апелин-13 с mAb. Сигнал ингибирования отражает способность конкурентного пептида связываться с mAb в растворе.

[00266] Для конкурентного анализа пептидов козы антигела к кроличьим IgG в карбонатном буфере для покрытия наносили на планшеты для ELISA с высокой степенью связывания с концентрацией 1 мкг/мл и оставляли на ночь. Смесь кроличьего mAb (C8, C24 или C25) и конкурентного пептида (таблица 7) предварительно инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, а затем добавляли биотин-апелин-13 (SEQ ID NO: 165), смешивали, и конечный раствор добавляли в планшеты для ELISA. После инкубации при комнатной температуре в течение 60 минут планшеты промывали, и затем добавляли конъюгированную со стрептавидином щелочную фосфатазу, и связывание детектировали путем добавления субстрата PNPP и считывания оптической плотности на планшетах для ELISA при 405 нм. Каждый конкурентный пептид или контрольный образец анализировали в двух экземплярах для заданного mAb. Ингибирование конкурентными пептидами связывания биотин-апелина-13 (SEQ ID NO: 165) с mAb к апелину показано на фиг. 3А-3С. «Нет конк.» - не добавляли конкурентный пептид; «Нет Ab, Нет конк.» - не добавляли ни конкурентный пептид, ни mAb к апелину. Как показано на фиг. 3А, в случае удаления одной аминокислоты на С-конце апелина 13, пептид не связывается с C8. Последовательная делеция N-концевых аминокислот апелина 13 не влияет на его связывание с C8 до тех пор, пока не будет удален остаток 8. Результат

картирования показывает, что C8 связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты KGPMMPF (SEQ ID NO: 188). Такие же результаты наблюдали для C24 и C25. Следовательно, все C8, C24 и C25 связываются с эпитопом, содержащим аминокислоты KGPMMPF (SEQ ID NO: 188).

[00267] Для дальнейшего понимания роли аминокислот в эпитопе 8-13 (KGPMMPF (SEQ ID NO: 188)) в связывании эпитопа с mAb C8, C14 или C25, с помощью аланин-сканирующего метода получали пептиды (таблица 8), и оценивали их способность ингибировать связывание биотин-апелина-13 (SEQ ID NO: 165) с этими mAb с помощью конкурентного анализа пептидов на основе ELISA, описанного выше. Ингибирование связывания биотин-апелина-13 (SEQ ID NO: 165) с mAb к апельину C8, C24 или C25, обусловленное полученными аланин-сканирующим методом пептидами показано на фиг. 4А-4С. Каждый пептид или контрольный образец анализировали в двух экземплярах для заданного mAb. Как показано на фиг. 4А, пептид 8А все еще блокирует связывание биотин-апелина-13 (SEQ ID NO: 165) с C8, но в меньшей степени, чем в случае апельина 13 (пептид 1-13), 9А или 10А. Пептиды 11А, 12А и 13А в значительной степени утратили способность блокировать связывание биотин-апелина-13 (SEQ ID NO: 165) с C8. Эти данные показывают, что боковые цепи остатков 11, 12 и 13 необходимы для связывания апельина с C8, и боковая цепь остатка 8 вносит некоторый вклад в связывание C8; боковые цепи остатков 9 и 10 не важны для связывания C8. Такие же результаты наблюдали для C24 и C25, как показано на фиг. 4В и 4С.

Таблица 7: Пептиды апельина, использованные в конкурентном анализе для mAb к апельину C8, C24 и C25.

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
1-17	KFRRQRPRLSHKGPMMPF	166
1-13	QRPRLSHKGPMMPF	165
1-12	QRPRLSHKGMP	181
2-13	RPRLSHKGPMMPF	182
3-13	PRLSHKGPMMPF	183
4-13	RLSHKGPMMPF	184
5-13	LSHKGPMMPF	185
6-13	SHKGPMMPF	186
7-13	HKGPMMPF	187
8-13	KGPMMPF	188
9-13	GPMMPF	189
10-13	PMPF	190
11-13	MPF	191

Таблица 8: Пептиды, полученные аланин-сканирующим методом из эпитопа 8-13, использованные в конкурентном анализе для mAb к апельину C8, C24 и C25

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
8А	AGPMMPF	192
9А	KAPMPF	193
10А	KGAMPF	194

11A	KGPAPF	195
12A	KGPMAPF	196
13A	KGPMPA	197

[00268] Сайты связывания антител для mAb к апелину C1, C6 и C7 картировали с помощью конкурентного анализа пептидов на основе ELISA, описанного выше, с использованием апелин-13-биотина (QRPRLSHKGPMMPF-биотин (SEQ ID NO: 165)) и конкурентных пептидов, приведенных в таблице 9. Ингибирование конкурентными пептидами связывания апелин-13-биотина (SEQ ID NO: 165) с mAb к апелину C1, C6 и C7 показано на фиг. 5A-5C. Как показано на фиг. 5A, в случае удаления одной аминокислоты на N-конце апелина 13, пептид не связывается с C1. Последовательная делеция C-концевых аминокислот апелина 13 не влияет на его связывание с C1 до тех пор, пока не будет удален остаток 5. Интересным оказалось то, что C1 не связывается с апелином 17 (пептид 1-17 в таблице 9), что свидетельствует о том, что для связывания C1 важен свободный N-терминальный конец апелина-13. Результат картирования показывает, что C1 связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты QRPRL (SEQ ID NO: 204) (пептид 1-5 в таблице 9). Такие же результаты наблюдали для C6 и C7.

[00269] Чтобы дополнительно понять роль аминокислот в эпитопе 1-5 (QRPRL (SEQ ID NO: 204)) в связывании эпитопа с mAb C6 или C7, с помощью аланин-сканирующего метода получали пептиды (таблица 10), и оценивали их способность ингибировать связывание апелин-13-биотина (SEQ ID NO: 165) с этими mAb с помощью конкурентного анализа пептидов на основе ELISA, описанного выше. Ингибирование полученными аланин-сканирующим методом пептидами связывания апелин-13-биотина (SEQ ID NO: 165) с mAb к апелину C6 или C7 показано на фиг. 6A-6B. Каждый пептид или контрольный образец анализировали в двух экземплярах для заданного mAb. Как показано на фиг. 6A и 6B, пептиды 1A, 2A, 3A, 4A и 5A потеряли способность блокировать связывание апелин-13-биотина (SEQ ID NO: 165) с C6 или C7. Эти данные указывают на то, что боковые цепи остатков 1, 2, 3, 4 и 5 необходимы для связывания апелина с C6 или C7.

Таблица 9: пептиды апелина, использованные в конкурентном анализе mAb к апелину C1, C6 и C7

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
1-17	KFRRQRPRLSHKGPMMPF	166
1-13	QRPRLSHKGPMMPF	165
2-13	RPRLSHKGPMMPF	182
1-12	QRPRLSHKGMP	181
1-11	QRPRLSHKGPM	198
1-10	QRPRLSHKGP	199
1-9	QRPRLSHKG	200
1-8	QRPRLSHK	201
1-7	QRPRLSH	202
1-6	QRPRLS	203
1-5	QRPRL	204

1-4	QRPR	205
-----	------	-----

Таблица 10: Пептиды, полученные аланин-сканирующим методом из эпитопа 1-5, использованные в конкурентном анализе для mAb к апельину C6 и C7

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
1A	ARPRL	206
2A	QAPRL	207
3A	QRARL	208
4A	QRPAL	209
5A	QRPRA	210

Пример 7. Гуманизация mAb к апельину

[00270] Кроличьи mAb к апельину C8 гуманизировали для снижения потенциала иммуногенности при использовании пациентами-людьми. Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей (VH и VL) сравнивали с последовательностями антител человека, имеющимися в базе данных Protein Data Bank (PDB), и строили модель гомологии с помощью SWISS-моделирования. CDR как в тяжелой, так и в легкой цепях кроличьего mAb прививали на человеческие каркасы, имеющие самую высокую вероятность сохранения надлежащей структуры, вероятно, необходимой для связывания антигена. При необходимости использовали обратные мутации от человеческих остатков к кроличьим остаткам. Последовательности гуманизованных областей VH и VL показаны в таблице 11 и таблице 12, соответственно. Гуманизованные области VH и VL сливали с человеческими константными областями тяжелой цепи и легкой каппа-цепи, соответственно, для получения гуманизованных mAb. Конструкции, соответствующие последовательностям mAb, использовали для временной трансфекции клеток HEK 293, и супернатанты анализировали на сродство каждого гуманизованного mAb к апельину. Значения KD гуманизованных mAb определяли на Biacore, используя биотин-апельин-13 (биотин-QRPRLSHKGMPMF (SEQ ID NO: 165)). Данные приведены в таблице 13.

[00271] Два дополнительных гуманизованных mAb (B24 и B25) получали с модификациями последовательности A31. Эти три mAb (A31, B24 и B25) клонировали на основную цепь человеческого IgG4 и тестировали с помощью анализа ELISA, в котором на планшетах иммобилизовали повышенные концентрации антител, и для связывания добавляли биотин-апельин-13 (биотин-QRPRLSHKGMPMF (SEQ ID NO: 165)) с последующим связыванием со стрептавидином, конъюгированным с щелочной фосфатазой. Затем связывание детектировали путем добавления субстрата PNPP и определения оптической плотности на планшетах для ELISA при 405 нм. Значения EC50 для кривых связывания ELISA показаны в таблице 14.

[00272] Кривые IC50 гуманизованного mAb к апельину A31 (на основной цепи человеческого IgG1) получали с помощью клеточного анализа, как описано выше. Активность апельина оценивали по его способности подавлять выработку цАМФ,

индуцированную форсколином (FSK), в клетках cAMP HunterTM CHO-K1 AGTRL1 Gi (DiscoverX # 95-0147C2), а активность mAb к апелину оценивали по его способности реверсировать ингибирующий эффект апелина. На фиг. 7А показан график IC₅₀, когда в анализе использовали апелин 13 (APL13); на фиг. 7В показан график IC₅₀, когда в анализе использовали пиро-апелин 13 (pyroAPL13). CPS - количество импульсов в секунду.

[00273] Влияние mAb к апелину A31 (на основной цепи человеческого IgG1) на рост опухоли тестировали на мышинной модели ксенотрансплантата. Клетки HUCCT1 (1×10^7) имплантировали NOD/SCID мышам и выращивали до тех пор, пока опухоли не достигли объема 150-200 мм³. После случайного распределения по группам (n=3 на группу) мышам вводили либо носитель, 0,5 мг/кг бевацизумаба, 20 мг/кг mAb A31, либо комбинацию 0,5 мг/кг бевацизумаба и 20 мг/кг mAb A31. Дозы вводили внутривенно 3 раза в неделю, а объемы опухолей измеряли в тот же день. На фиг. 8 показаны объемы опухолей в разных группах во время исследования. Данные указывают на то, что комбинация mAb A31 с бевацизумабом оказывает сильное ингибирующее влияние на рост опухоли.

Таблица 11: Последовательности переменных областей тяжелой цепи гуманизированных mAb к апелину

Клоны mAb	VH
A11	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWVS SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSTLYLQMNSLTAEDTAVYYCAKGGY RPGASVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 211)
A21	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWVS SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSTVYLLQMNSLTAEDTATYFCAKGGY RPGASVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 212)
A31	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWVG SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSTVYLLQMNSLTAEDTATYFCAKGGY RPGASVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 213)
A41	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWVG SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSTVYLLKMNSPTAEDTATYFCAKGGY RPGASVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 214)
A33	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWVG SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSTVYLLQMNSLTAEDTATYFCAKGGY RPGASVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 213)
A43	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWVG SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSTVYLLKMNSPTAEDTATYFCAKGGY RPGASVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 214)

B24	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLYTNRVSWVRQAPGKGLEWVG SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSTVYLKMNSPTAEDTATYFCAKGGY RPGGSIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 217)
B25	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLYTNRMSWVRQAPGKGLEWVG SIGSSPWFASWALGRFTISRDNSTVYLKMNSPTAEDTATYFCAKGGYR PGASVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 218)

VH: переменная область тяжелой цепи

Таблица 12: Последовательности переменных областей легкой цепи гуманизированных mAb к апельсину

Клоны mAb	VL
A11	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSQSIYDNNDLAWYQQKPGKTPKRLI YLASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCAGGYSGDIYT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 215)
A21	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSQSIYDNNDLAWYQQKPGKTPKRLI YLASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCAGGYSGDIYT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 215)
A31	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSQSIYDNNDLAWYQQKPGKTPKRLI YLASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCAGGYSGDIYT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 215)
A41	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSQSIYDNNDLAWYQQKPGKTPKRLI YLASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCAGGYSGDIYT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 215)
A33	AQVLTQSPSSLSASVGDRVITACQSSQSVYDNNDLAWYQQKAGQTPKR LIYLASSLD SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQCEDVATYYCAGGYSGDIY TFGGGTEVVVE (SEQ ID NO: 216)
A43	AQVLTQSPSSLSASVGDRVITACQSSQSVYDNNDLAWYQQKAGQTPKR LIYLASSLD SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQCEDVATYYCAGGYSGDIY TFGGGTEVVVE (SEQ ID NO: 216)
B24	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSQSIYDNNDLGWYQQKPGKTPKRLI YLASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCAGGYSGDIYT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 219)
B25	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSQSIYDNNDLAWYQQKPGKTPKRLI YLASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCAGGYNGDIYT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 220)

VL: переменная область легкой цепи

Таблица 13: Значения KD гуманизированных mAb к апелину в анализе Biacore

Клоны mAb	KD
A11	0,126 пМ
A21	1,65 фМ
A31	0,148 пМ
A41	0,067 пМ
A33	0,0143 пМ
A43	3,26 пМ

Таблица 14: Значения IC50 для гуманизированных mAb в анализе связывания ELISA

Клоны mAb	EC50 (нМ)
A31	0,21
B24	0,79
B25	0,47

[00274] Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отклонения от общей концепции изобретения. Следовательно, предполагается, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными раскрытыми вариантами осуществления и охватывает модификации, находящиеся в пределах сущности и объема настоящего изобретения, определенных настоящим описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 168, 169, 170, 171, 102 и 172, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 50, 51, 52, 110, 111 и 112, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 173, 174, 175, 176, 114 и 115, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 68, 177, 178, 128, 129 и 130, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 74, 75, 76, 134, 135 и 136, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 179, 78, 180, 137, 138 и 139, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 83, 84, 85, 143, 144 и 145, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 86, 87, 88, 146, 147 и 148, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 89, 90, 91, 149, 150 и 151, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 92, 93, 94, 152, 153 и 154, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 95, 96, 97, 155, 156 и 157, соответственно; или
- (12) SEQ ID NO: 98, 99, 100, 158, 159 и 160, соответственно;

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с апельсином, предпочтительно человеческим апельсином.

2. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 или 39, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 или 40.

3. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или п.2, содержащее:

а. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2;

б. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4;

с. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6;

д. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;

е. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

полипептидную последовательность SEQ ID NO: 36;

s. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 37, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 38; или

t. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 39, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 40.

4. Выделенное моноклональное антитело к апелину или антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 188.

5. Выделенное моноклональное антитело к апелину или антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204.

6. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.4 или п.5, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активность апелина.

7. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.4, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент способно связываться с апелином-13, пиро-апелином-13, апелином-17, апелином-36, апелином-55 и/или другими формами апелина, которые имеют такой же С-терминальный конец, как и апелин-13.

8. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.5, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент способно связываться с апелином-13 и пиро-апелином-13.

9. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

10. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

11. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.10, содержащее:

a. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 211, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

b. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 212, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

c. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 213, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

d. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 214, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

e. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 213, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 216;

f. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 214, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 216;

g. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 219; или

h. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 220.

12. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11.

13. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.12.

14. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.13.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Способ блокирования связывания агенина с рецептором агенина у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

17. Способ лечения диабетической ретинопатии (DR) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

18. Способ лечения возрастной макулярной дегенерации (AMD) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

19. Способ лечения диабетического макулярного отека (DME) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

20. Способ лечения макулярного отека после окклюзии вен сетчатки (RVO) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

21. Способ лечения дегенерации сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

22. Способ лечения миопической хориоидальной неоваскуляризации (mCNV) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

23. Способ лечения диабетической нефропатии у нуждающегося в этом субъекта,

включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

24. Способ лечения хронического заболевания почек (CKD) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

25. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

26. Способ лечения цирроза печени у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

27. Способ лечения неоваскуляризации бляшек у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

28. Способ лечения рубеоза радужной оболочки у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

29. Способ лечения неоваскулярной глаукомы у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

30. Способ лечения неоваскуляризации роговицы (CNV) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

31. Способ лечения ретинопатии недоношенных (ROP) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

32. Способ лечения ретинопатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

33. Способ лечения макулярной дегенерации у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

34. Способ лечения синдрома гиперстимуляции яичников (OHSS) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

35. Способ лечения маточного кровотечения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

36. Способ лечения эндометриоза у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

37. Способ лечения гиперплазии эндометрия и рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

38. Способ лечения лейомиом миометрия у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

39. Способ лечения аденомиоза у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

40. Способ лечения фиброза тканей у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

41. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

42. Способ по п.41, причем фармацевтическая композиция дополнительно содержит второй противораковый агент.

43. Способ по п.42, причем второй противораковый агент представляет собой анти-

VEGF средство.

44. Способ по п.43, причем анти-VEGF средство представляет собой авастин или биологически аналогичное средство бевацизумаб.

45. Способ по п.43, где анти-VEGF средство представляет собой блокатор VEGFR1 и/или VEGFR2.

46. Способ определения уровня апелина у субъекта, включающий:

(а) получение образца от субъекта;

(b) приведения образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-11; и

(с) определение уровня апелина у субъекта.

47. Способ по п.46, в котором образец представляет собой образец ткани.

48. Способ по п.47, в котором образец ткани представляет собой образец раковой ткани.

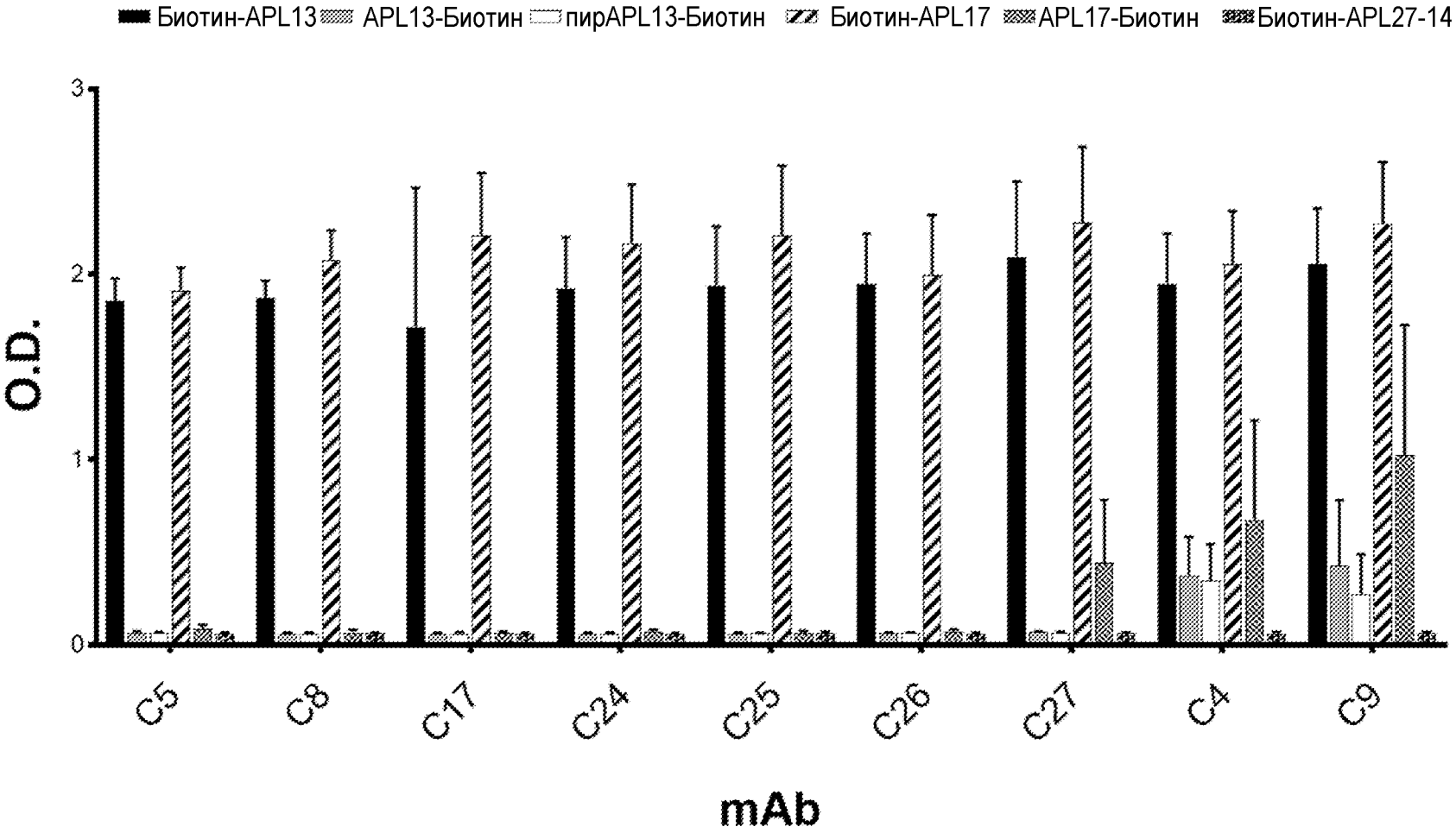
49. Способ по п.46, в котором образец представляет собой образец крови.

50. Способ получения моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продуцирования моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

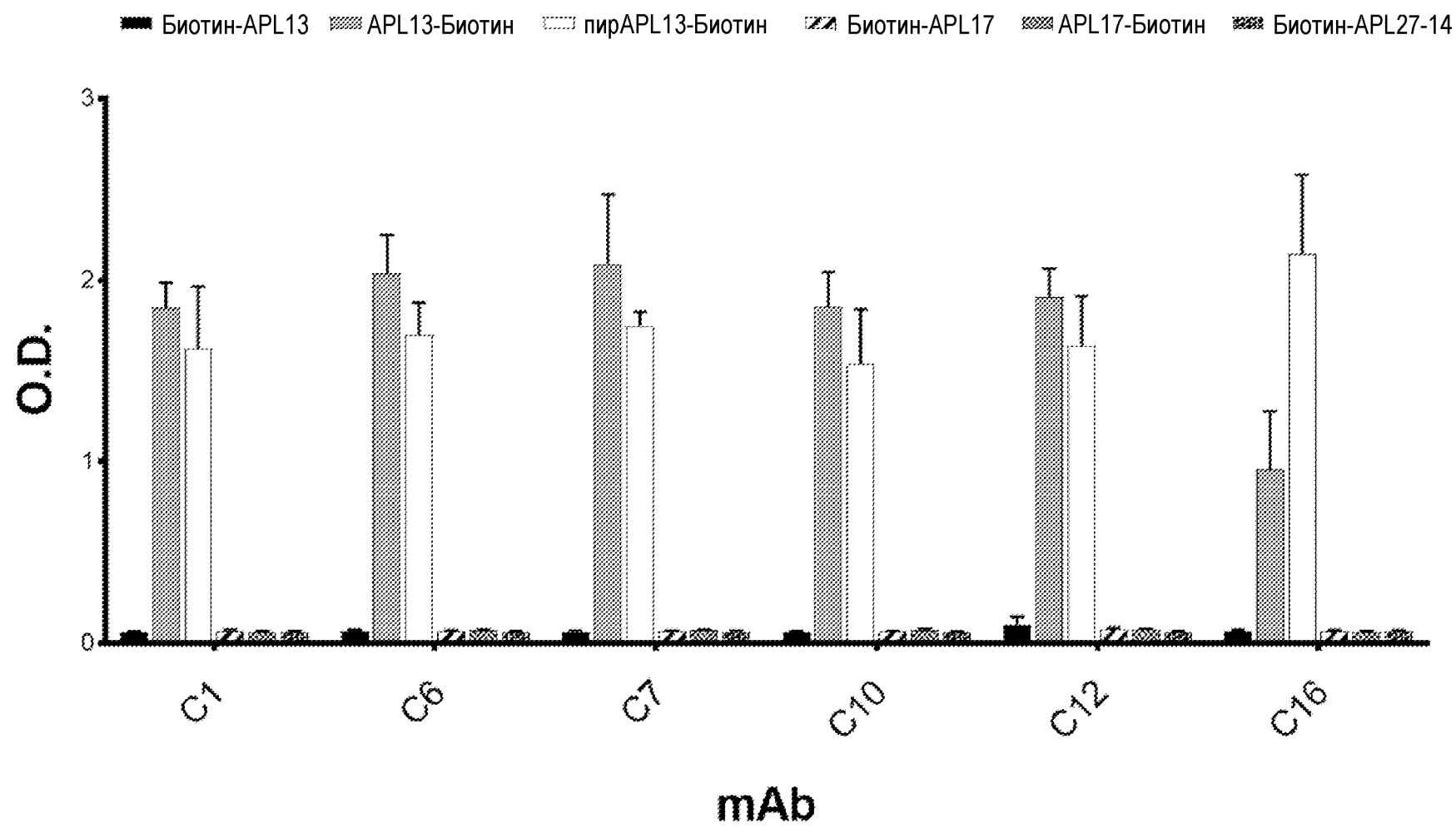
51. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, включающий объединение моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

По доверенности

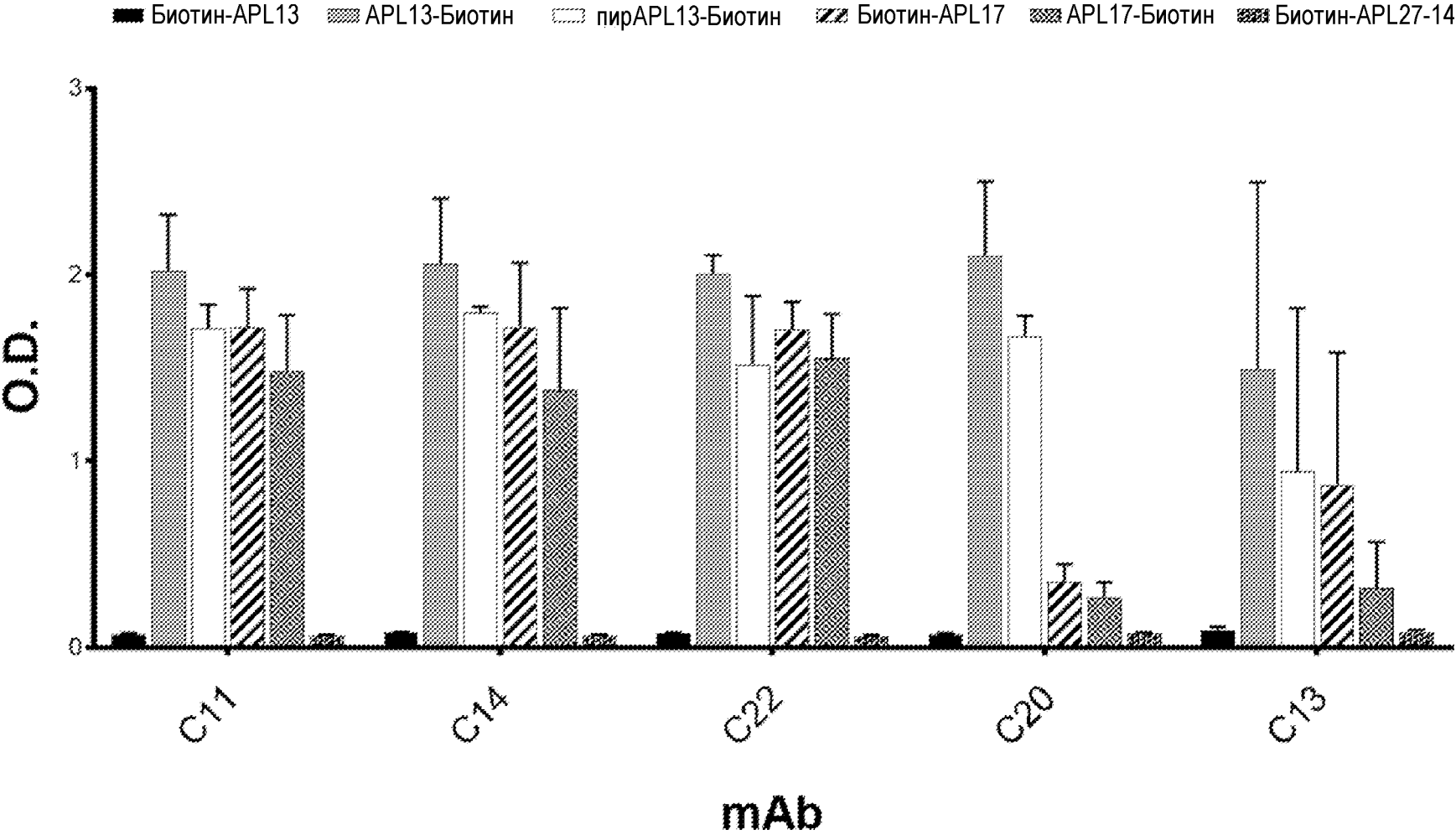
ФИГ.1А



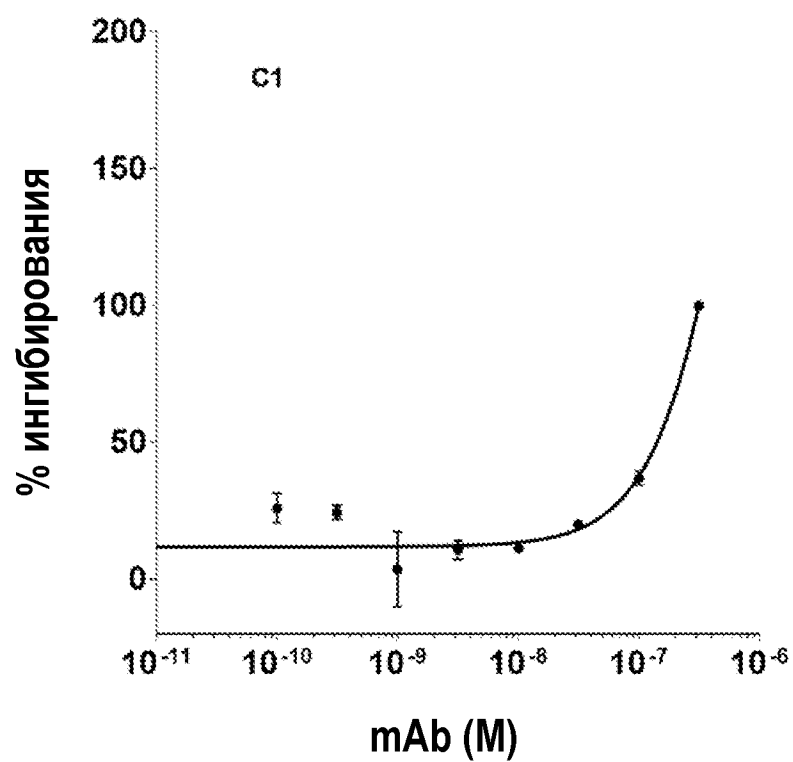
ФИГ.1В



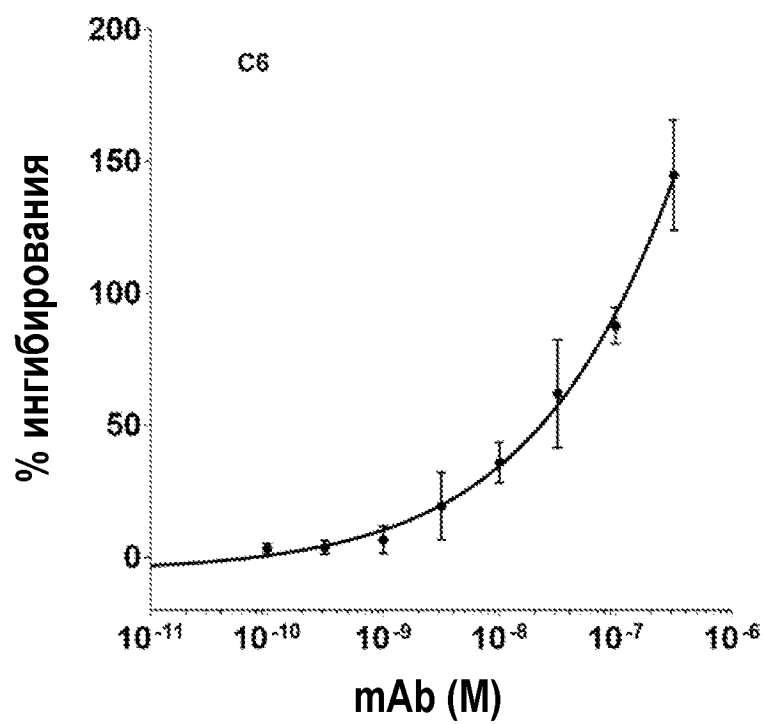
ФИГ.1С



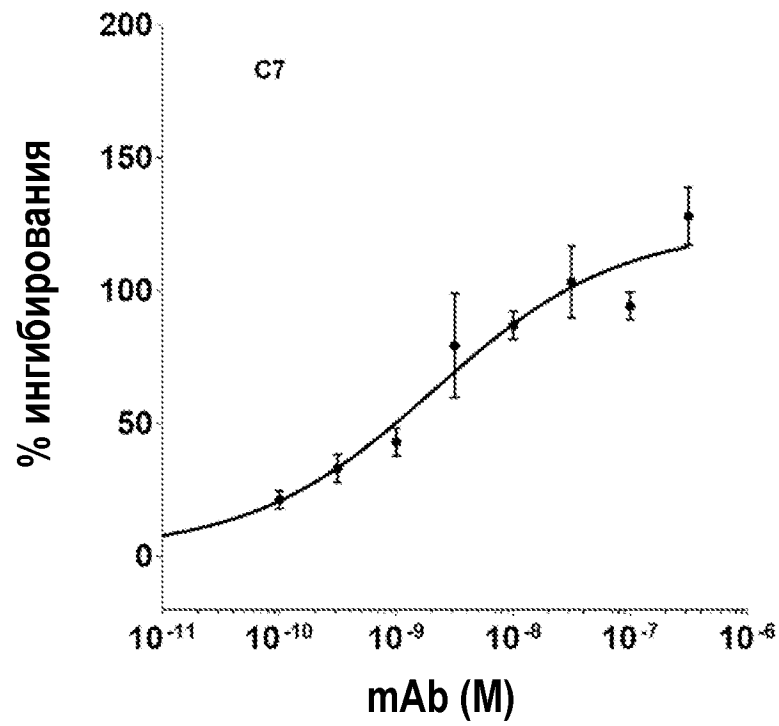
ФИГ.2А



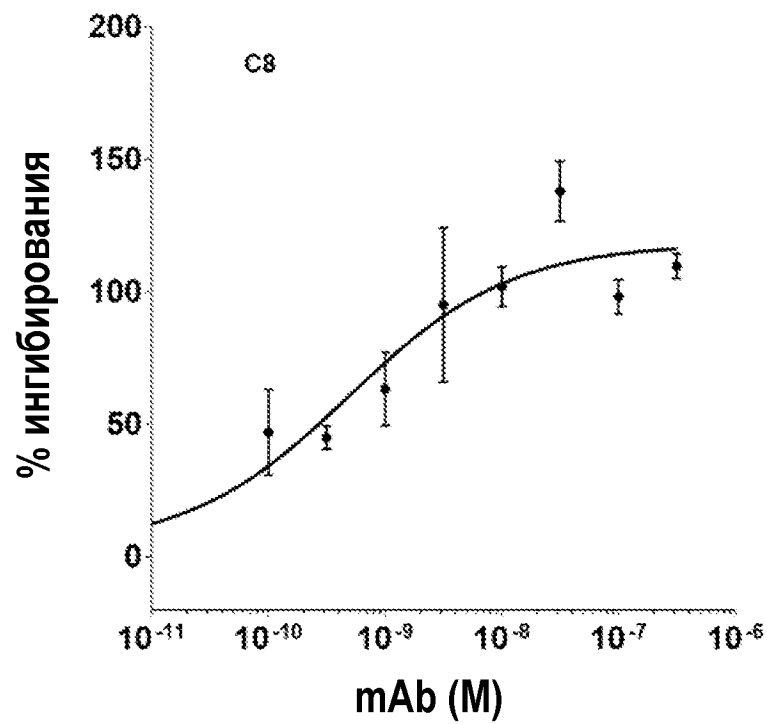
ФИГ.2В



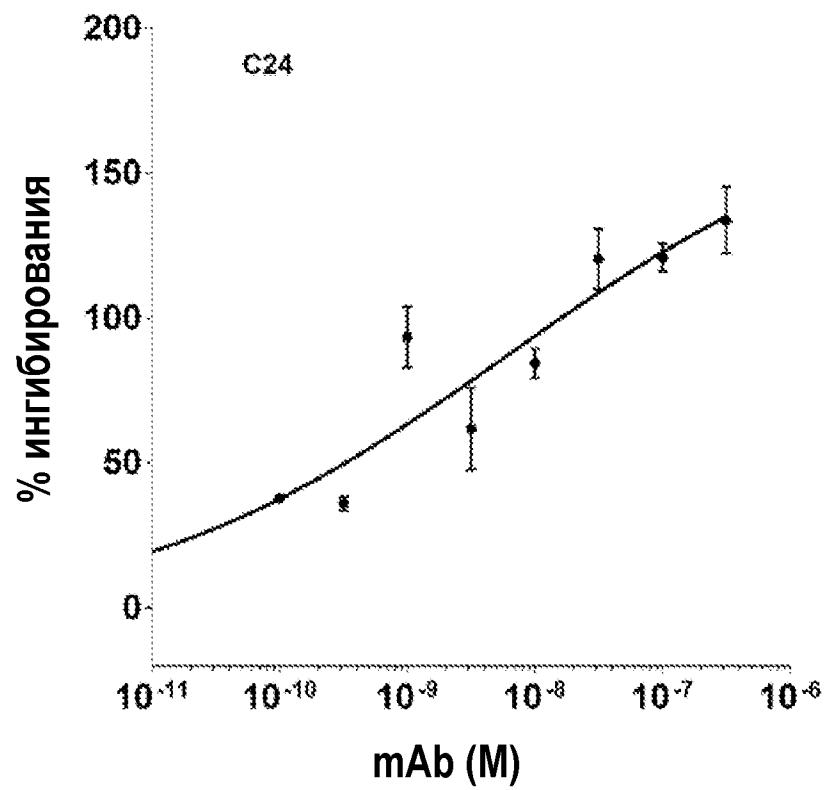
ФИГ.2С



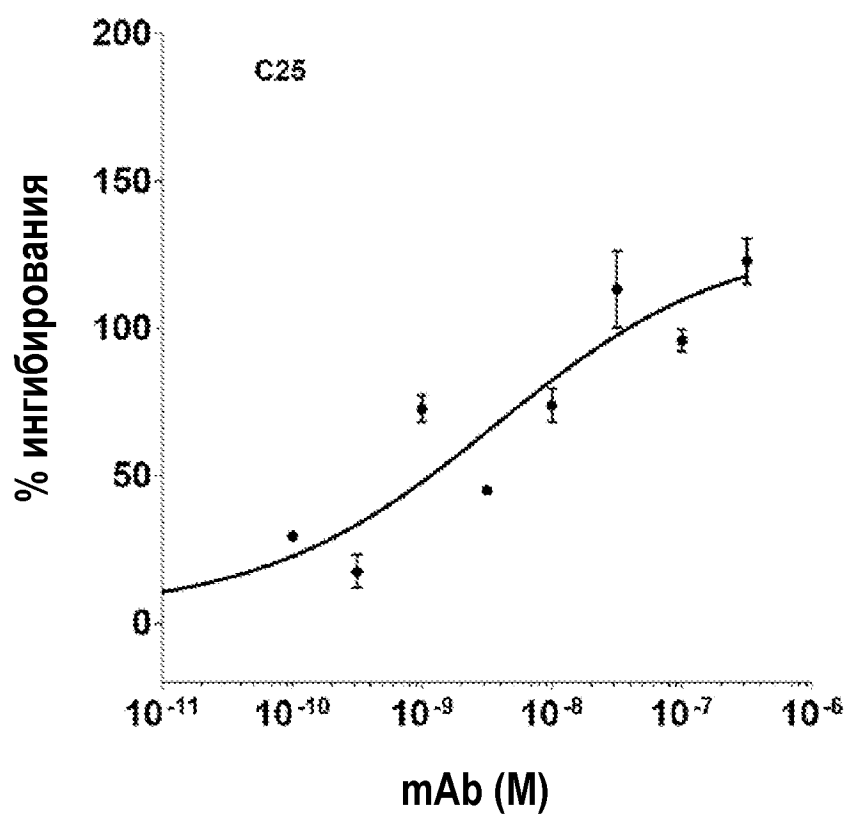
ФИГ.2D



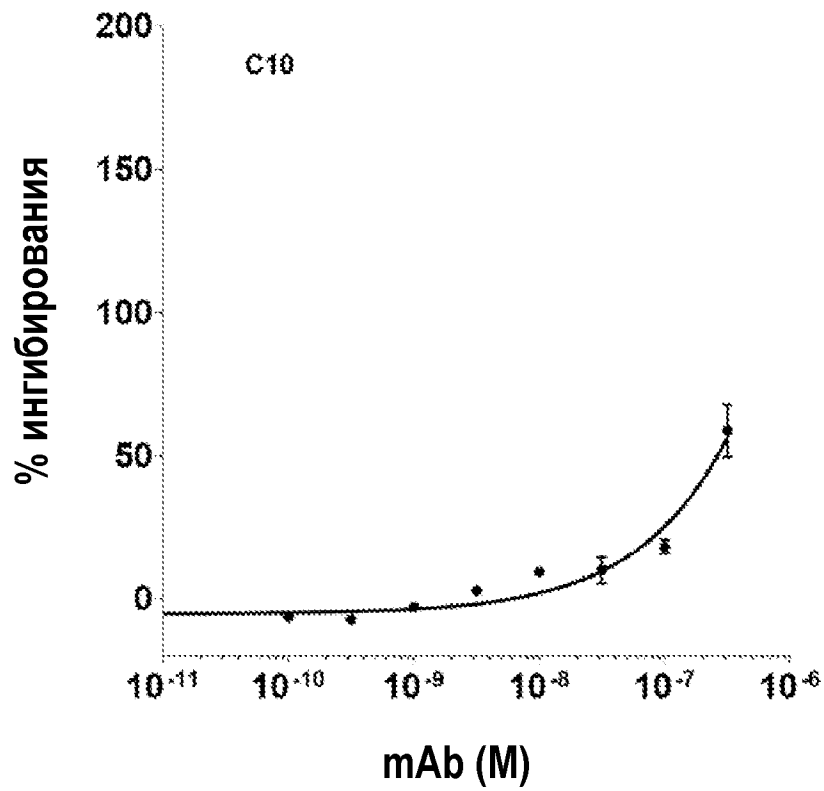
ФИГ.2Е



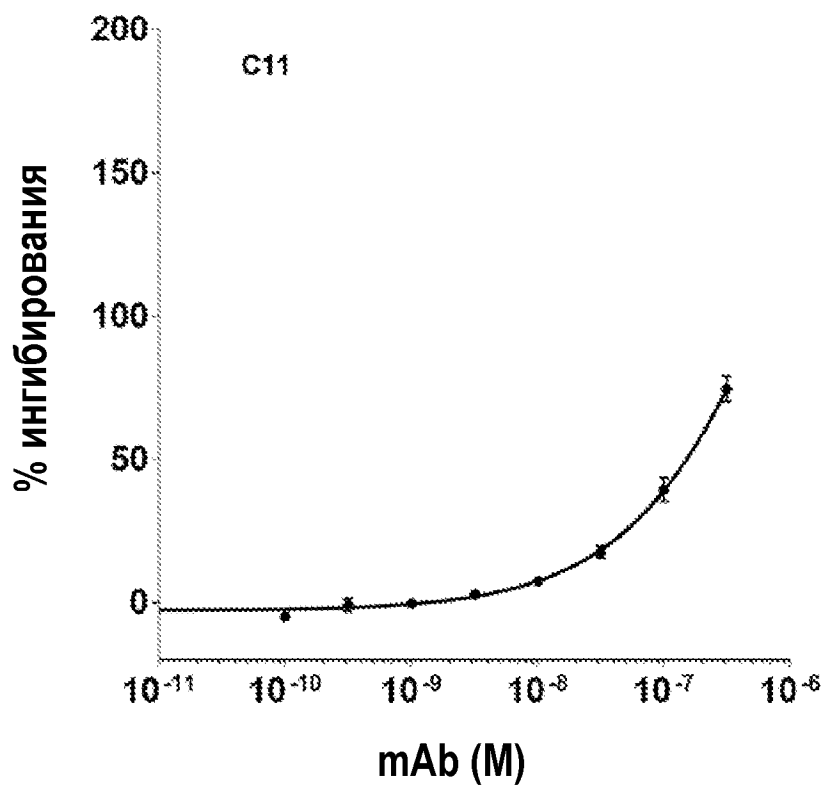
ФИГ.2F



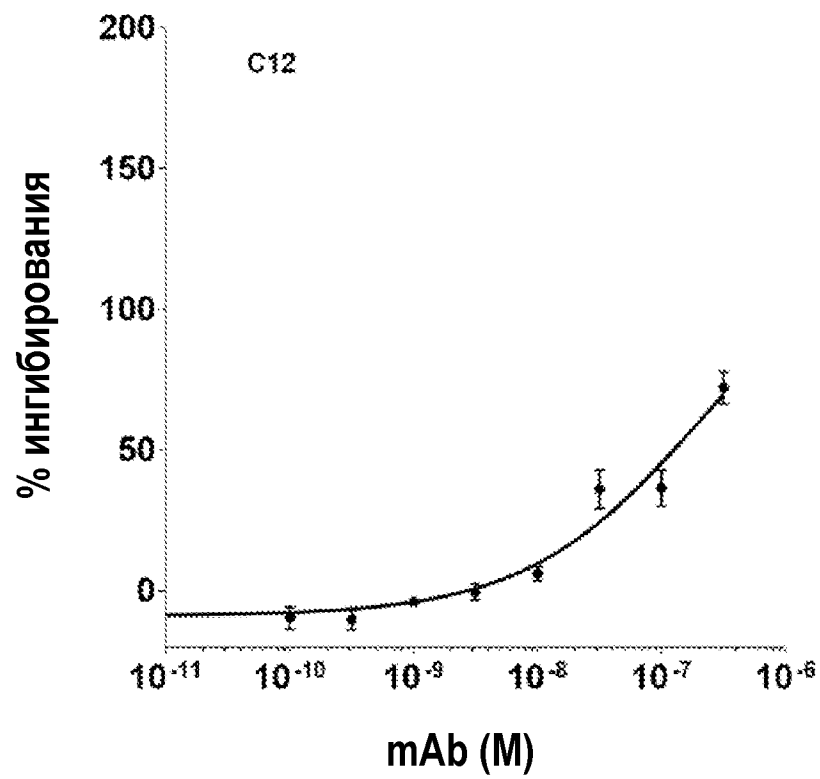
ФИГ.2G



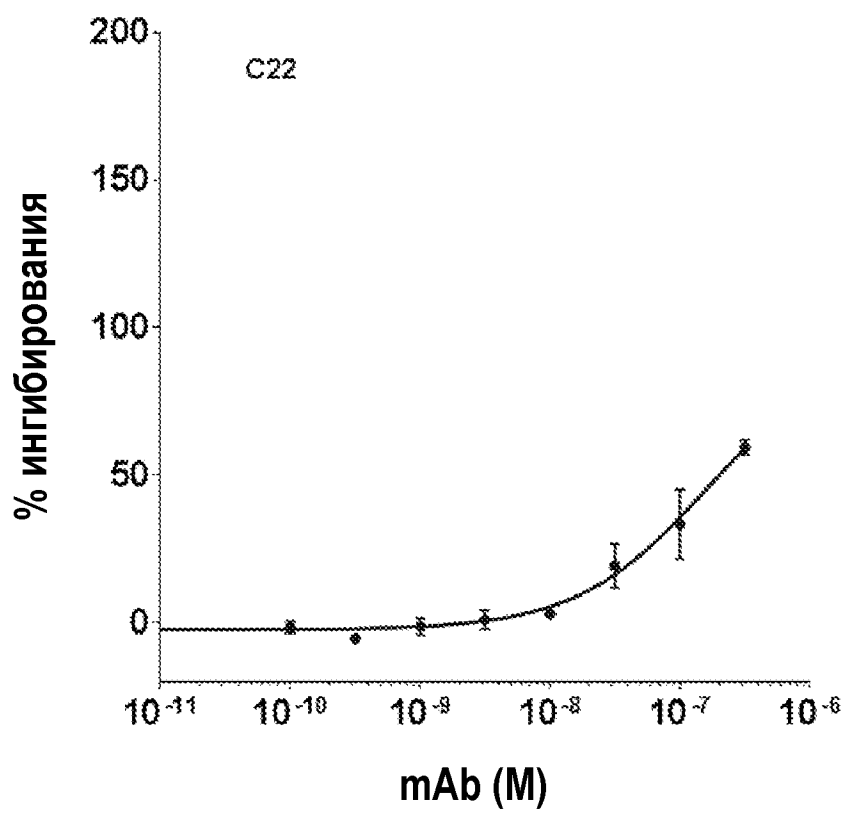
ФИГ.2H



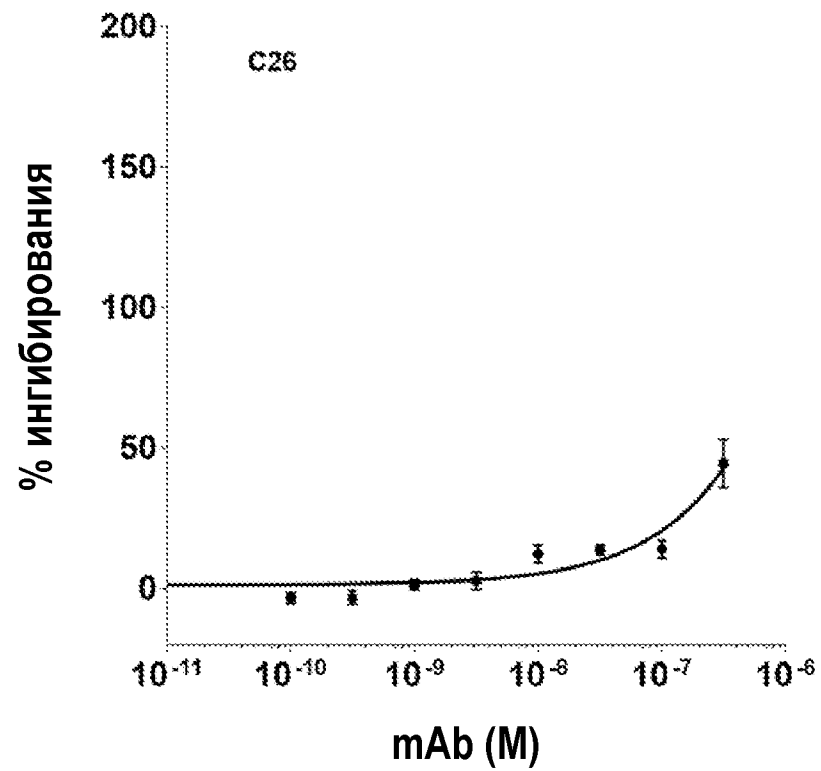
ФИГ.2I



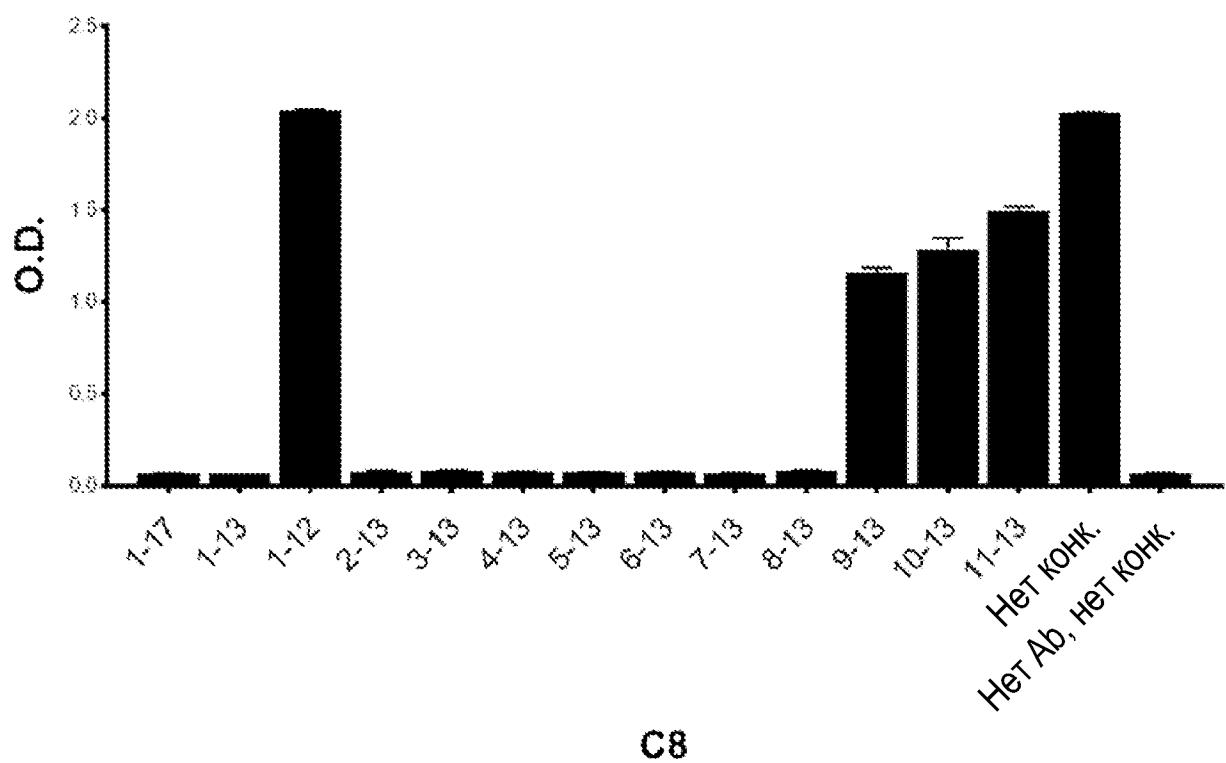
ФИГ.2J



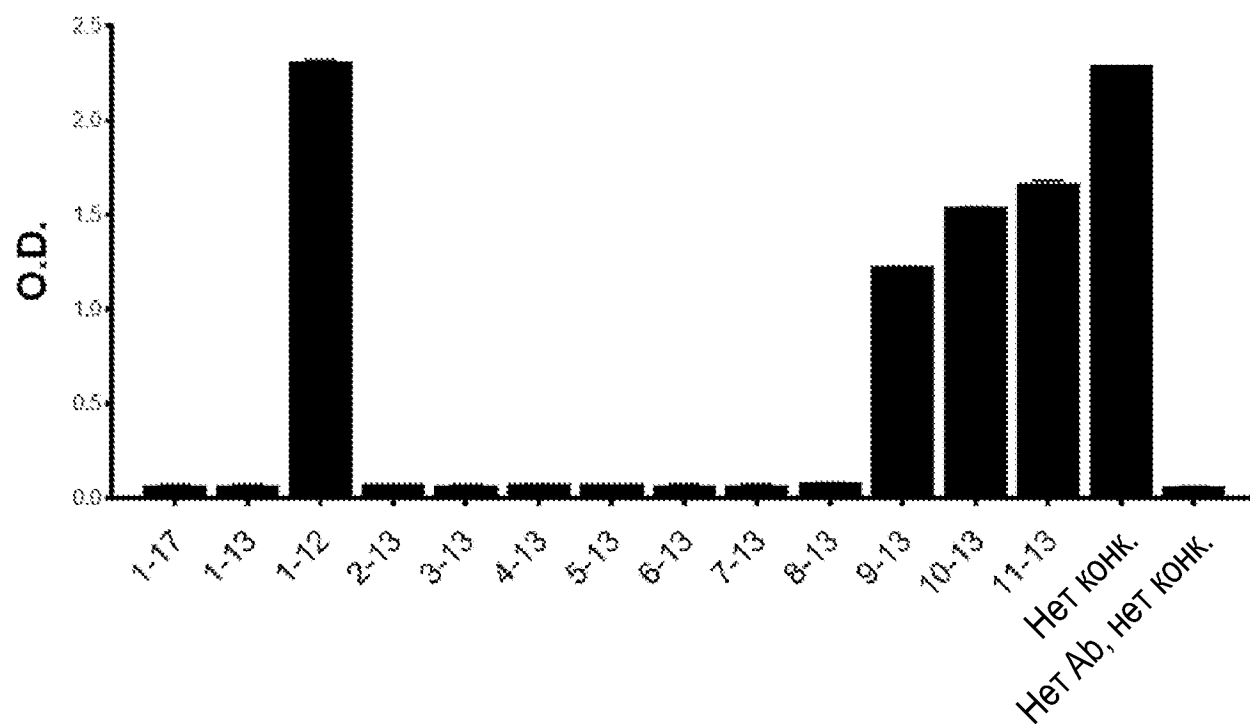
ФИГ.2К



ФИГ.3А

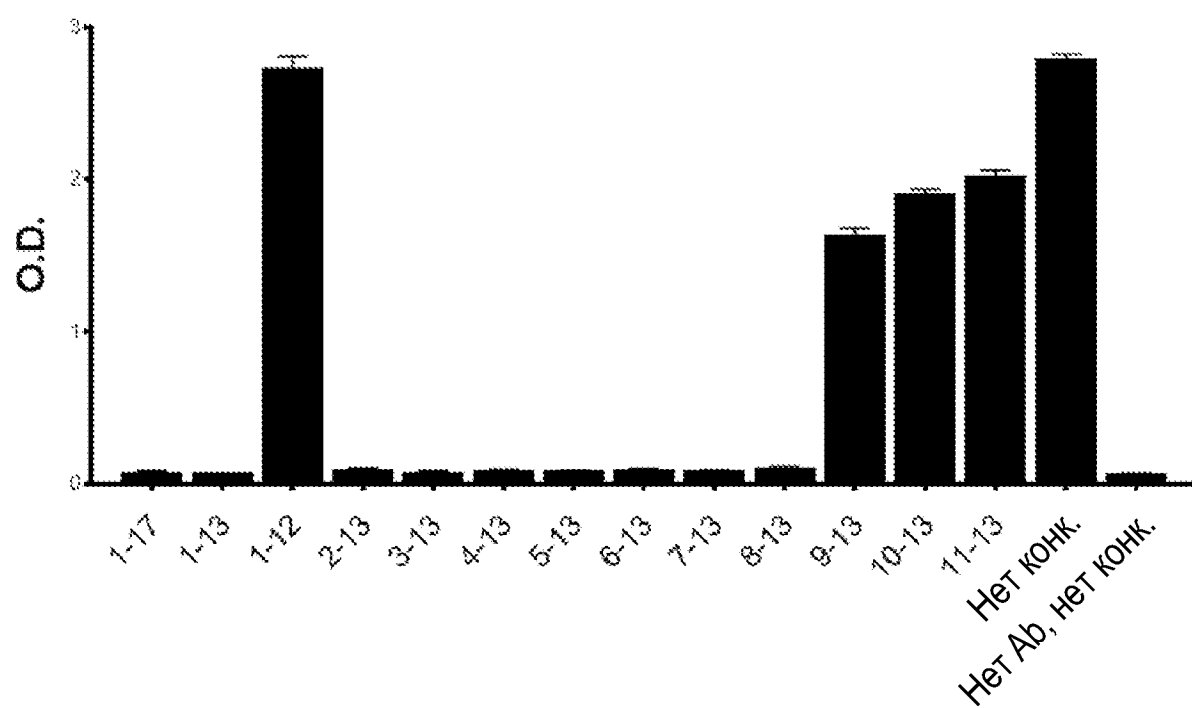


ФИГ.3В



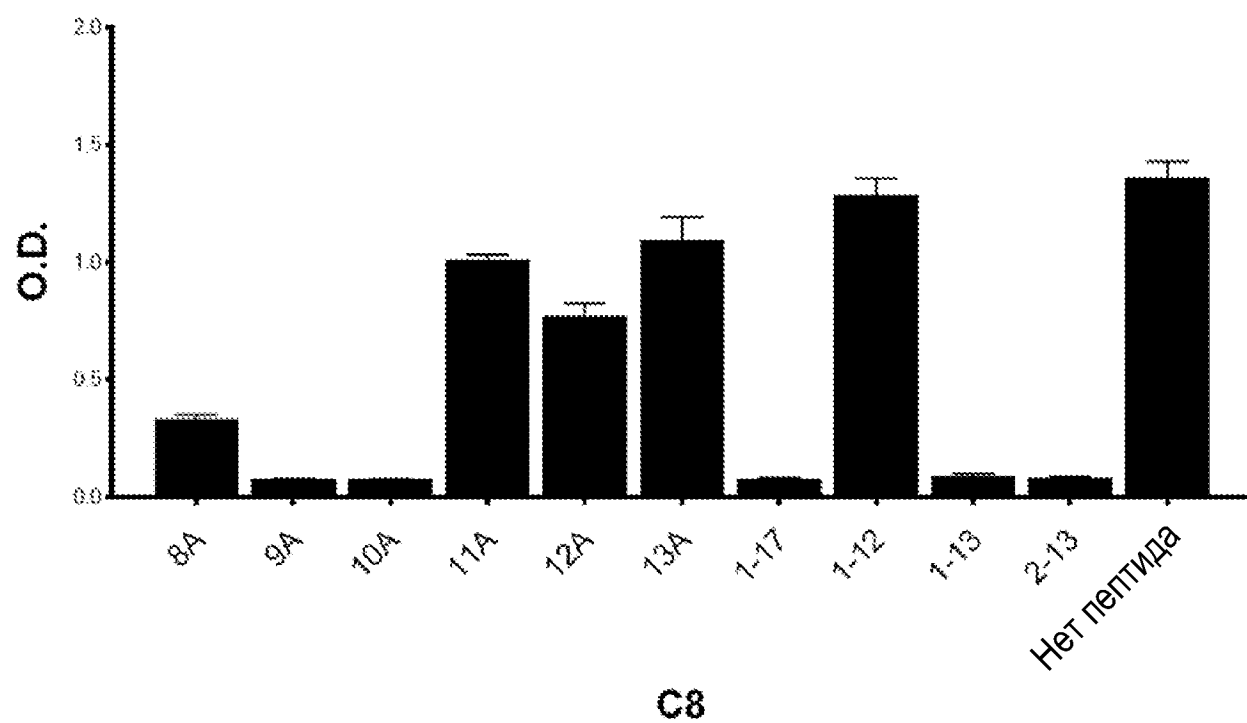
C24

ФИГ.3С

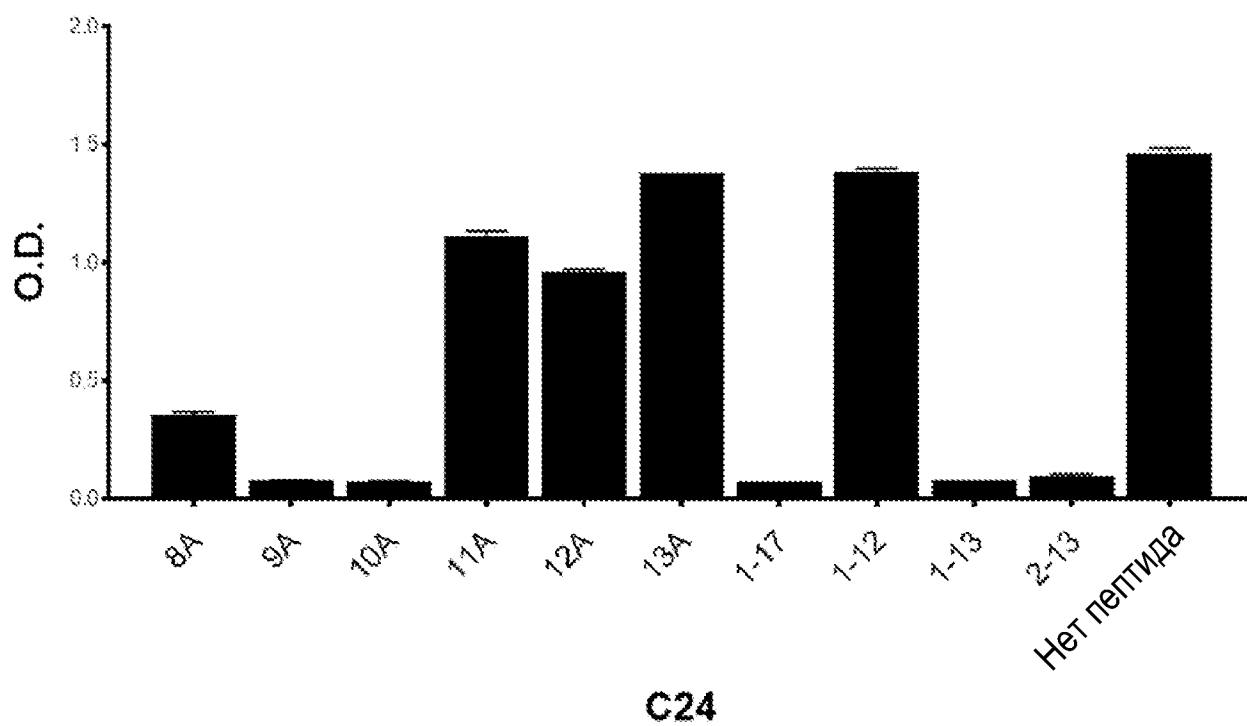


C25

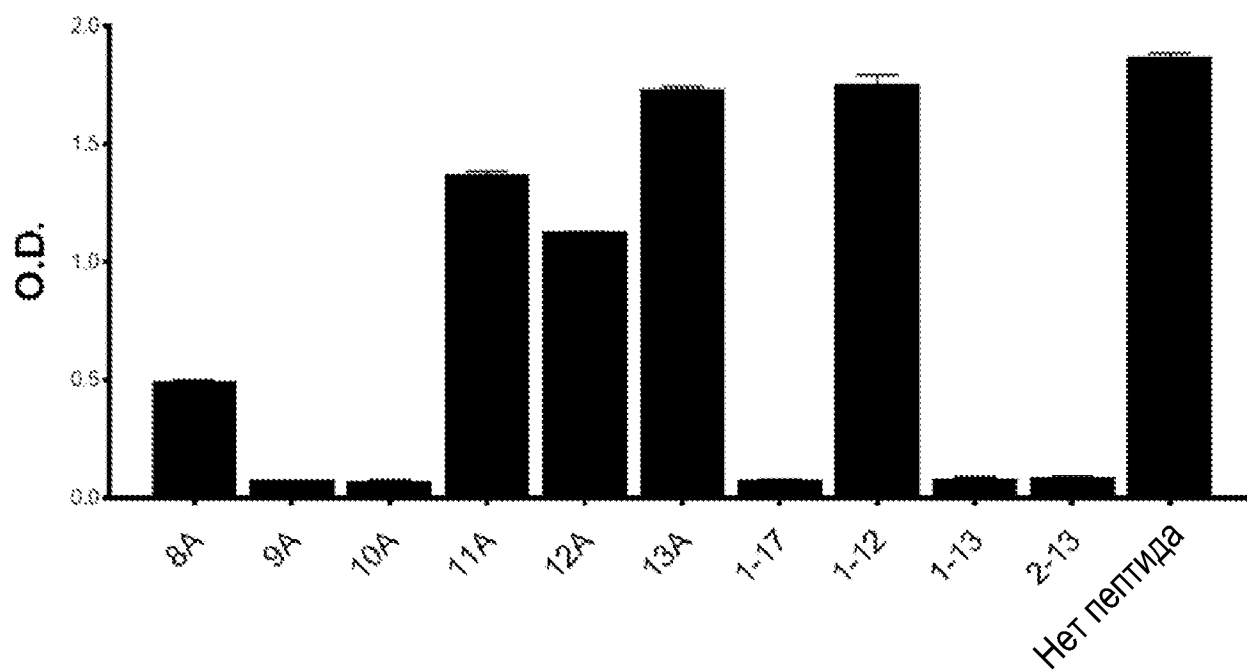
ФИГ.4А



ФИГ.4В

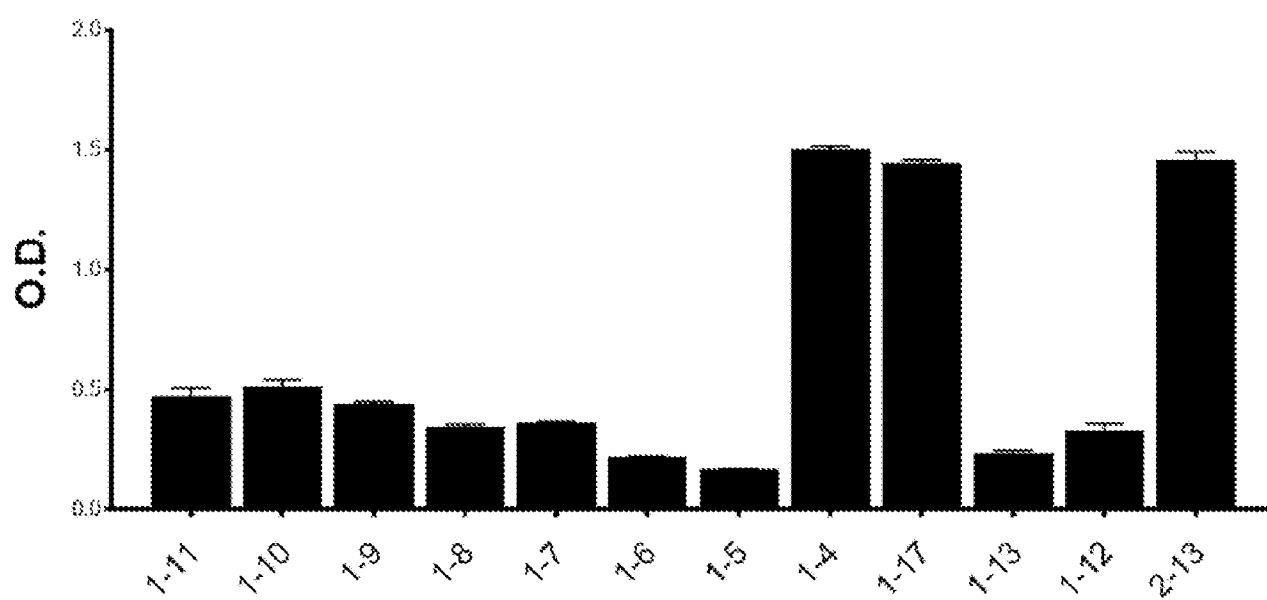


ФИГ.4С



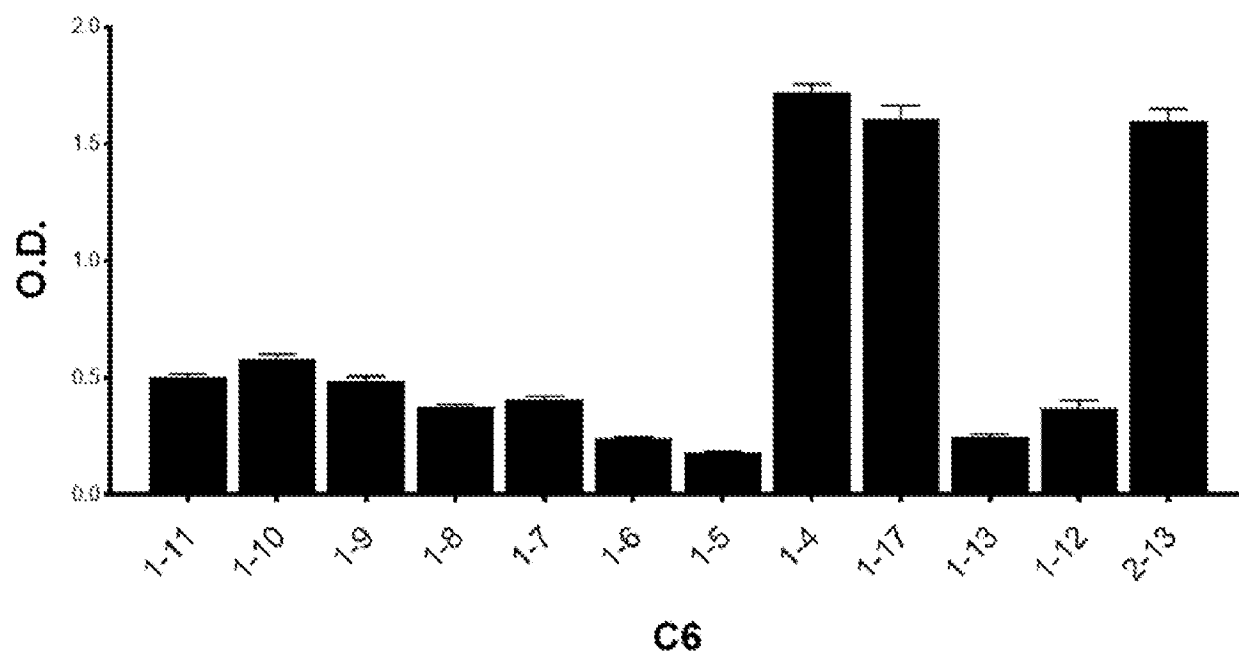
C25

ФИГ.5А

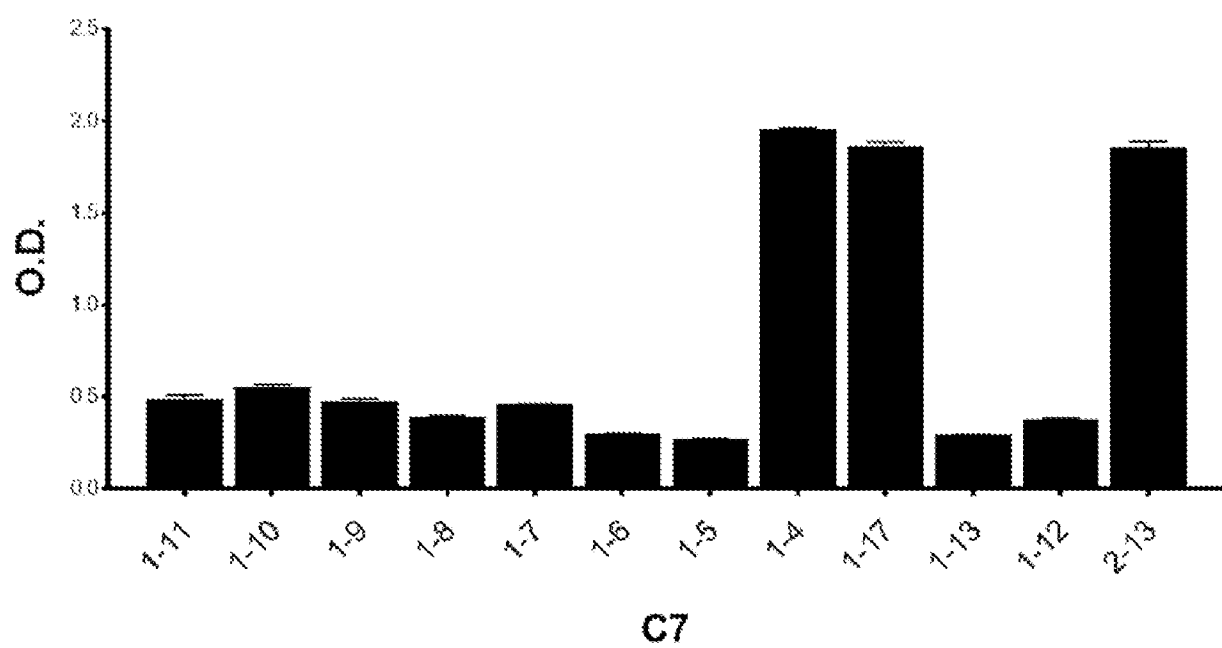


C1

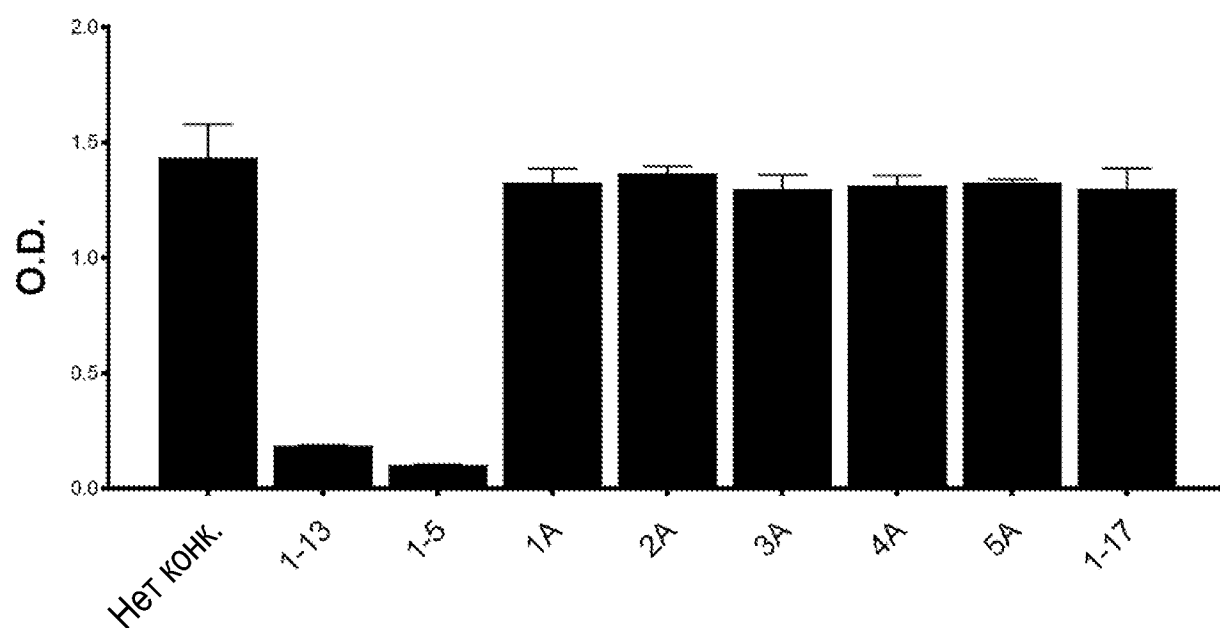
ФИГ.5В



ФИГ.5С

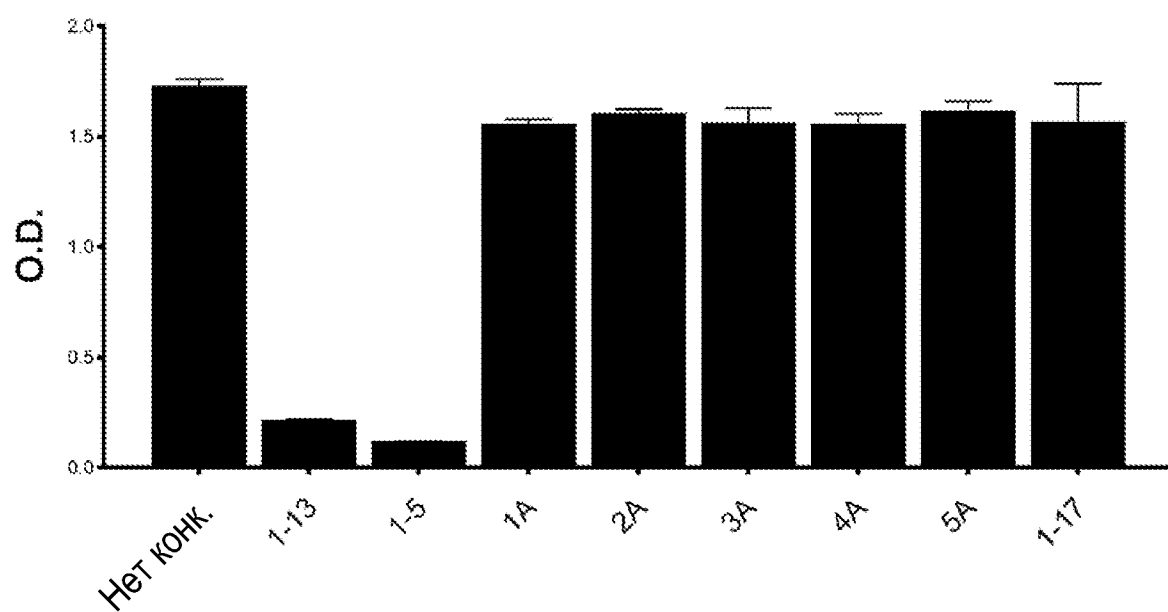


ФИГ.6А



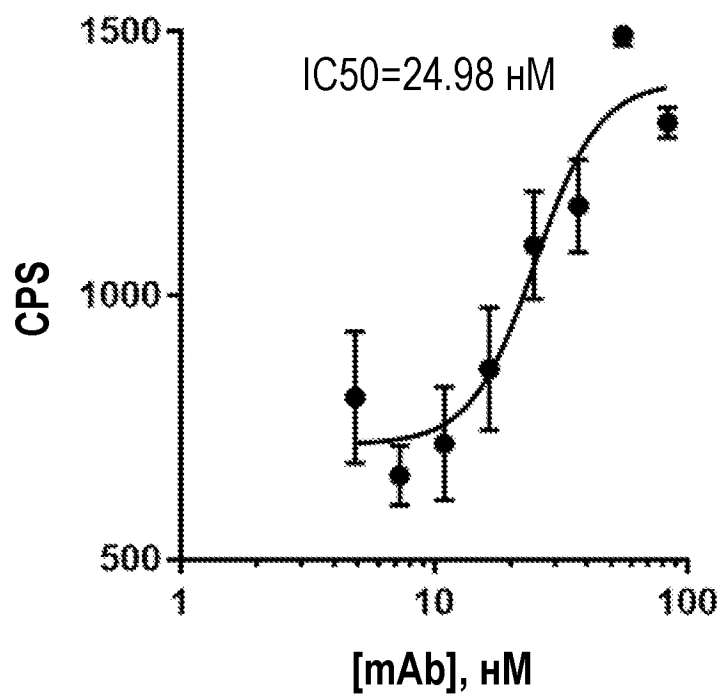
C6

ФИГ.6В

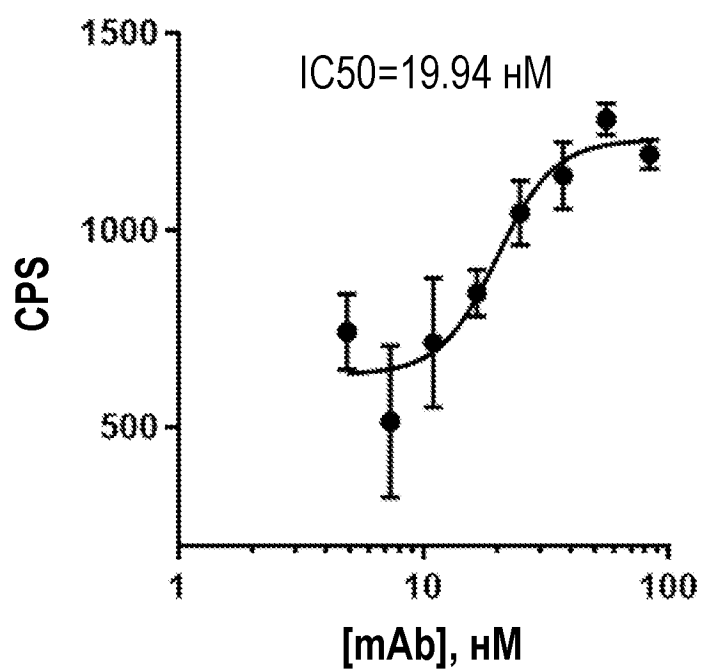


C7

ФИГ.7А



ФИГ.7В



ФИГ.8

