

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290101** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.28

(22) Дата подачи заявки
2020.06.25

(51) Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ANGPT2

(31) **62/867,253; 63/013,022**

(32) **2019.06.27; 2020.04.21**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/039477**

(87) **WO 2020/264065 2020.12.30**

(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

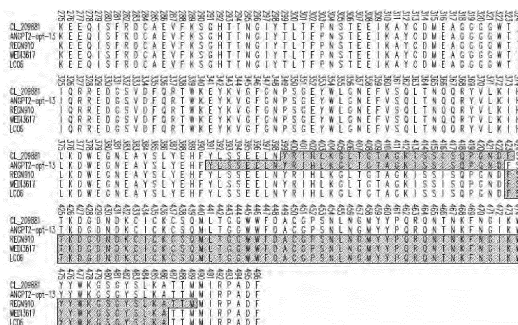
(72) Изобретатель:

**Фрайер Райан Майкл, Чжэн Чао,
Дзегелевски Майкл, Гупта Панкадж
(US), Буйссу Тьерри, Никлин Пол (DE)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к новым нейтрализующим антителам к ангиопозтину 2 (ANGPT2) для терапевтических и диагностических способов и композициям, которые их содержат.



A1

202290101

202290101

A1

[0000] В настоящей заявке содержится Перечень последовательностей, который был подан электронно в ASCII формате и таким образом полностью включен путем ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 11 июня 2019 г., называется 09-0697-US-1 SL.txt и имеет размер 78465 байт.

[0001] Настоящее изобретение в целом относится к нейтрализующим антителам к ангиопоэтину 2 (ANGPT2) для диагностического и терапевтического применения. Более специфически, описаны антитела к ANGPT2 и способы применения для лечения различных заболеваний или нарушений, характеризующимися клетками, экспрессирующими ANGPT2. Также описаны фармацевтические композиции и наборы, содержащие антитела к ANGPT2.

[0002] Эндотелиальная дисфункция является характерным признаком хронической болезни почек (CKD) и связанных сердечно-сосудистых осложнений. Основные и клинические исследования свидетельствуют о том, что улучшение почечной сосудистой функции при CKD будет уменьшать протеинурию и уменьшать снижение функции почек вдобавок к SOC. Дополнительно, полагают, что уменьшение ANGPT2 будет оказывать положительное влияние на сердечно-сосудистые заболевания у пациентов с CKD, включая сердечную недостаточность, ИМ, удар и другие (Eleuteri 2011, Lukasz 2013, Poss 2015, Lorbeer 2015, Tsai 2016, Gerstein 2015, Chen 2009, Chen 2010a, Chen 2010b, Gurnik 2016).

[0003] Ось ANGPT-Tie человека состоит из рецепторов тирозинкиназ I
30 двух типов (Tie1, Tie2) и двух секретируемых лигандов (ANGPT1, ANGPT2).
ANGPT1 представляет собой агонист Tie2 рецептора, который индуцирует
фосфорилирование рецептора и активирует нижерасположенные пути передачи
сигналов, необходимые для сохранения сосудистой функции почек, в то время

как ANGPT2 является функциональным антагонистом связывания ANGPT1 с Tie2. ANGPT1-связанный Tie2 транслоцируется в интер-эндотелиальные межклеточные контакты, где мультимерный ANGPT1 может образовывать перекрестно-эндотелиальные комплексы с Tie2 рецепторами со смежных клеток для стабилизации клубочковой капиллярной структуры. Внутриклеточно, ANGPT1-индуцированное Tie2 фосфорилирование приводит к захвату адапторных белков, что вызывает активацию АКТ способствующих выживанию путей и подавляет активацию апоптотического пути.

[0004] В небольшом исследовании, изучающем роль ANGPT2 при диабетической нефропатии (DN), описан SNP (1233 A/G), связанный с 20% увеличение циркулирующего ANGPT2 и последующего увеличения тяжести DN (Quan, 2012). В то время как не было тестировано ANGPT2 блокирующих антител у пациентов с СКД, было обнаружено, что экспрессия мРНК ANGPT2 у индейцев племени Пима с СКД положительно связана с интерстициальным фиброзом и интимальным фиброзом. Другими авторами было показано, что экспрессия мРНК ANGPT2 в клубочках повышена у пациентов с диабетической нефропатией (DN) по сравнению с ее уровнями при здоровых почках (Dessapt-Baradez, 2014). Однако, как экспрессия мРНК ANGPT1 в клубочках (Dessapt-Baradez, 2014), так и циркулирующий белок (Chang, 2013; Chang, 2014) были неизменными при DN, таким образом отдавая предпочтение ANGPT2-связанному Tie2 в контексте прогрессирования заболевания.

[0005] Ключевые клинические наблюдения, связывающие нарушение регуляции ANGPT2-Tie2 пути с СКД были перенесены из исследований, где пациенты были стратифицированы на стадии (от стадии 1 до ESRD/HD) и где циркулирующий ANGPT2 прогрессивно повышался, коррелируя с артериальной ригидностью (Chang, 2014), и обратно коррелируя со снижением измеренной с помощью инулина скорости клубочковой фильтрации (GFR) (David, 2010). В пределах группы пациентов СКД 3-5, уровни ANGPT2 также были связаны с тяжестью альбуминурии и маркерами системного микро-воспаления (Chang, 2013). По меньшей мере некоторое количество повышенного ANGPT2, присутствующего при СКД, может быть вызвано уменьшением miR-145, что нормально подавляет транскрипцию ANGPT2, и было показано, что существенно уменьшается у пациентов на стадиях 3-5 СКД (Chen, 2013). Недавний постер, представленный Американским объединением нефрологов (Peters, 2018) для

пациентов с непролиферативной диабетической ретинопатией с исходной альбуминурией >30 мг/г указывает на то, что стимуляции пути передачи сигналов Tie2 с использованием тирозинфосфатазы белка эндотелия сосудов (VE, АКВ-9778 (ежедневно, п/к инъекция), было достаточно для уменьшения соотношения альбумин/креатинин в моче (UACR) приблизительно на 20% в 3-месячном исследовании в Фазе 2А. Эти результаты подтверждают, что стимуляции пути передачи сигналов Tie2 у пациентов с тяжелой альбуминурией достаточно для уменьшения прогрессирования СКД. Клинически важными значениями для категоризации СКД пациентов являются: eGFR 15 - 60 мл/мин/1,73 м² и UACR 30 мг/г или больше.

[0006] В соответствии с концепцией о том, что нарушение регуляции оси ANGPT2-Tie2 способствует СКД, в доклинических исследованиях было показано, что генетические манипуляции с любой стороной пути передачи сигналов (снижение ANGPT1 или увеличение ANGPT2) являются достаточными для вызывания проявлений заболевания. У мышей, условная делеция ANGPT1 вызывает протеинурическую нефропатию, которая характеризуется нарушением функции клубочкового фильтрационного барьера, альбуминурией, и патологическими характерными признаками, наблюдаемыми у людей с прогрессирующей диабетической нефропатией (расширение мезенгиального матрикса и гломерулосклероз; Jeansson, 2013). Дополнительно, сверхэкспрессия подоцит-специфического ANGPT2 приводит к увеличенной альбуминурии, апоптозу эндотелия клубочков и уменьшению белков фильтрационного барьера (Davis, 2007). Другими исследователями было показано, что экспрессия ANGPT2 в плазме и почках после 5/6 нефрэктомии у CD1 мышей сочетается с повышенным ANGPT2 окрашиванием в клубочках (Chang, 2014). Той же группой было показано, что ANGPT2 пептитело, L1-10, после 5/6 нефрэктомии блокирует сосудистую экспрессию и повышенно регулирует профибротические и провоспалительные маркеры, включая TGF β 1, подтипы коллагена, и молекулы адгезии, хотя влияния на фиброз почек не изучались.

[0007] ANGPT2 главным образом экспрессируется в тканях, подвергаемых сосудистому ремоделированию и повышен в кровообращении при различных болезненных состояниях, включая СКД. Эндотелиальные клетки (EC) продуцируют и хранят ANGPT2 в тельцах Вейбеля-Палада, специализированных гранулах для хранения, из которых ANGPT2 может быстро высвободиться в

кровоток для связывания с кровяными и лимфатическими ЕС Tie2 рецепторами (Fiedler, 2004).

[0008] В нормальных почках человека, ANGPT2 и Tie2 экспрессируются на ЕС, включая те, которые обращены в клубочковую базальную мембрану, в пределах капиллярных петель, и ЕС в пределах клубочков. Tie2 также экспрессируется на ЕС, смежных с подоцитарными ножками (Satchell, 2002).

[0009] Tie2 агонистический лиганд, ANGPT1, секретируется из перицитов (Satchell, 2001), которые окружают и поддерживают нижерасположенные эндотелиальные клетки, и также важно из подоцитов (Satchell, 2002), специализированных клеток почек, которые составляют клубочковый фильтрационный барьер, таким образом, предоставляя возможность перекрестного взаимодействия между подоцитами и смежными клубочковыми ЕС для стабилизации капиллярной структуры клубочков.

[0010] ANGPT2 имеет ограниченную экспрессию в нормальных тканях, но широко экспрессируется в активно remodelируемой сосудистой сети опухолей человека. Блокирование ANGPT2 ингибирования Tie2 передачи сигналов является привлекательной мишенью для антиангиогенной противораковой терапии и глазных заболеваний на сосудистой основе. Некоторые антитела, блокирующие связывание ANGPT2 с Tie2, были разработаны для клинического применения.

[0011] Специфически, на основании исследований с ANGPT2-селективными антителами (REGN910), которые вводили в/в, не было обнаружено дозоограничивающих опасений относительно безопасности в Фазе I клинических исследований (Papadopoulos, 2016). Tie2-стимулятор (AKB-9778) тестировали в Фазе II с отсутствием заслуживающих внимания побочных явлений (AE) (Camprochiago, 2016), и в различных клинических исследованиях на Фазе III, тестировали двойной ANGPT1/2 блокатор (AMG386) только со слабыми и обратимыми AE (Monk, 2014). Однако, менее селективные терапевтические подходы с низким соотношением блокады ANGPT2:ANGPT1 (например, AMG386, MEDI3617) были связаны с повышенным наблюдением клинического отека, который может быть связан с двойной блокадой лимфатических Tie2 рецепторов, поскольку оба ANGPT1 и ANGPT2 действуют в качестве агонистов Tie2 рецептора в лимфатической сосудистой сети. Полагают, что блокада Tie2 нарушает нормальное течение лимфатической и

венозной циркуляции, что приводит к внеклеточному накоплению жидкости в целом и специфически к лимфатическому отеку (Monk, 2013). Полагают, что высоко специфическое ANGPT2 блокирующее антитело будет иметь существенно уменьшенный риск отека; не наблюдали отека по Шкале 3-4 в Фазе I исследований с применением REGN910 (Papadopoulos, 2015).

[0012] ANGPT2 блокада может влиять на сосудистую и лимфатическую ответную реакцию и функцию.

[0013] По некоторым данным, ANGPT2 принимает участие в регенерации печени (Hu, 2014); уменьшает пластичность сосудистого ложа; изменяет восстановление печени и других тканей (Gale, 2002), потенциально включая ткани легких, жировую ткань (An, 2017) и яичников (Сохон, 2010); и в качестве аутокринного регулятора, переключает воспалительные ответные реакции эндотелиальных клеток (Fiedler, 2006, Kim, 2016).

[0014] Роль ANGPT2 в лимфатической системе взрослых особей не полностью известна. Тем не менее, Tie2 экспрессируется на лейкоцитах различных типов (моноцитах, нейтрофилах и эозинофилах) и модуляцию пути передачи сигналов Tie2 может изменять иммунную чувствительность (Grenga, 2015).

[0015] ANGPT2 блокада является привлекательным механизмом предотвращения других респираторных нарушений, включая повышенную проницаемость сосудов легких, пульмональный (легочный) отек, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), острое повреждение лёгких (ALI), идиопатическую интерстициальную пневмонию, идиопатический фиброз лёгких (IPF) и выраженное обострение IPF, тяжёлый острый респираторный синдром (SARS), и ближневосточный респираторный синдром (MERS). Высокие уровни ANGPT2 в плазме крови играют центральную роль в аберрантной транссудации, связанной с увеличением в плазме фактора Виллебранда (стандартный маркер повреждения эндотелия) при сепсисе и ARDS (Calfee, 2012). Уровни ANGPT2 и фактора Виллебранда в плазме крови существенно повышены у пациентов с сепсисом и еще более высокие у пациентов с ARDS (Van der Heijden, 2008). Циркулирующий ANGPT2 существенно повышен у людей с сепсисом, которые также имеют нарушенное насыщение кислородом. Сыворотка от этих пациентов разрушает в условиях *in vitro* эндотелиальную архитектуру. Этот эффект септической сыворотки обращается с помощью ANGPT-1 (антагонист ANGPT2)

(Parikh, 2006). На мышинной модели ARDS, индуцированного геморрагическим шоком, предварительное лечение мышей с применением антитела к ANGPT2 существенно улучшает функцию легких, насыщение крови кислородом и коэффициент выживания (Lomas-Neira, 2016)

5 **[0016]** Увеличенная проницаемость сосудов (гиперпроницаемость сосудов) способствует различным заболеваниям, включая ARDS, сепсис, тяжёлый сепсис, септический шок, злокачественное новообразование и воспаление. Уменьшенная повышенная проницаемость сосудов легких будет уменьшать накопление жидкости в альвеолярном пространстве (отек легких) и, следовательно, будет улучшать газообмен между легким и сосудами, приводя к лучшей оксигенации артериальной крови. Улучшение оксигенации артериальной крови приводит к лучшей оксигенации всех органов (например, головного мозга, сердца, печени, почек) и уменьшает риск полиорганной недостаточности, приводящей к смерти.

10 **[0017]** Увеличение сосудистой проницаемости при сепсисе, тяжёлом сепсисе, септическом шоке, также описано в нескольких органах, таких как легкие, почки, печень и сердце. Накопление жидкости в этих органах нарушает их надлежащее функционирование (например, вызывая аритмию, нарушение клубочковой фильтрации или нарушение метаболизма) и приводит к недостаточности органа с последующей смертью.

15 **[0018]** Пулмональный (легочный) отек представляет собой состояние, при котором легкие наполняются жидкостью. Наиболее распространенной причиной отека легких является застойная сердечная недостаточность. Другие менее распространенные состояния, которые могут вызывать отек легких, включают резкое повышение кровяного давления, пневмонию, почечную недостаточность, повреждение легких, вызванное тяжелой инфекцией, тяжёлый сепсис крови, или заражение крови, вызванное инфекцией.

20 **[0019]** Острое повреждение лёгких (ALI) представляет собой легочное нарушение, часто вызываемое вдыханием дыма, в последнее время, путем применения Е-сигарет или вейпинговых продуктов.

25 **[0020]** Острый респираторный дистресс-синдром (ARDS) представляет собой воспаление легких, которое характеризуется увеличением проницаемости сосудов легких и/или отеком легких. ARDS часто характеризуется как легкий, средний или тяжелый на основании степени гипоксемии. ARDS может

запускаться несколькими причинами, например, он может индуцироваться бактериальной или вирусной легочной инфекцией, сепсисом, ингаляцией вредных веществ, тяжелой пневмонией, травмой, панкреатитом (воспаление поджелудочной железы), массивными переливаниями крови и ожогами.

5 Наиболее частой причиной ARDS является сепсис.

[0021] Тяжёлый острый респираторный синдром (SARS) представляет собой вирусное респираторное заболевание, вызываемое коронавирусом, называемым SARS-ассоциированный коронавирус (SARS-CoV). SARS

10 начинается с высокой температуры (температура выше 100,4°F [$>38,0^{\circ}\text{C}$]). Другие симптомы могут включать боль в горле, кашель, головную боль, общее чувство дискомфорта и боль в теле. Некоторые люди также могут иметь слабые респираторные симптомы в начале развития заболевания. У большинства пациентов развивается пневмония. С 2004 года до вспышки пандемии SARS-CoV-2 в декабре 2019 года, во всем мире не было описано известных случаев

15 SARS.

[0022] Ближневосточный респираторный синдром (MERS) представляет собой заболевание, вызываемое вирусом (более специфически, коронавирусом), называемым коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV). Заболевание характеризуется тяжелым респираторным нарушением,

20 включая лихорадку, кашель и одышкой. Приблизительно три или четыре из каждых 10 пациентов, у которых описан MERS, погибают.

[0023] Сепсис, тяжёлый сепсис и септический шок представляют собой нарушения, развивающиеся вследствие системной воспалительной ответной реакции на инфекцию (см. Mitchell M. Levy и др., Crit Care Med. 2003

25 Apr;31(4):1250-6). Сепсис представляет собой нарушение, имеющее как инфекционную природу (например, вирусную, бактериальную, травму брюшной полости, перфорацию кишечника), так и системную воспалительную ответную реакцию. Это приводит к увеличению проницаемости сосудов в некоторых органах, таких как почки, печень, сердце и легкие. Тяжёлый сепсис (сепсис с

30 дисфункцией органов) относится к сепсису с острой недостаточностью органов, вызываемой сепсисом. Септический шок относится к стабильной гипотензии, необъясненной другими причинами.

[0024] Таким образом, существует потребность в высоко аффинном нейтрализующем антителе к ANGPT2, которое будет ограничивать

антагонистическое связывание ANGPT2 сTie2, полагают, что усиленная Tie2 передача сигналов может иметь различные благоприятные эффекты, включая, например, стабилизацию структуры клубочковых капилляров, уменьшение эндотелиальной активации и восстановление целостности фильтрационного барьера. В целом, полагают, что эти благоприятные эффекты снижают протеинурию и сохраняют почечную функцию, что приводит к замедлению прогрессирования заболевания у пациентов с хронической болезнью почек (CKD).

[0025] Также полагают, что благоприятные эффекты высоко аффинного нейтрализующего антитела к ANGPT2 помогают лечению пациентов, страдающих от повышенной проницаемости сосудов легких и ассоциированных нарушений.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0026] Настоящее изобретение обеспечивает моноклональные антитела, которые специфически связываются с ANGPT2 человека. В одном аспекте согласно изобретению, антитела согласно настоящему изобретению нейтрализуют ANGPT2. Таким образом, антитела согласно изобретению пригодны, например, для лечения и/или предотвращения заболеваний или нарушений, которые можно облегчить путем нейтрализации ANGPT2.

[0027] В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает антитело к ANGPT2, в особенности гуманизированное антитело к ANGPT2, имеющее одно или несколько свойств, описанных далее в настоящей заявке.

[0028] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 17 (H-CDR3), и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 19 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 22 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3),

или

- вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 14 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 17 (H-CDR3); и
- 5 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 19 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 22 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3),
- или
- 10 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16 (H-CDR3); и
- 15 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 20 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 23 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3),
- или
- 20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16 (H-CDR3); и
- 25 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 21 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 23 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 25 (L-CDR3),
- или
- 30 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16 (H-CDR3); и
- 30 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 20 (L-CDR1); аминокислотную

последовательность SEQ ID NO. 22 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3).

[0029] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 8, соответственно,

или

вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO. 4 и SEQ ID NO. 9, соответственно,

или

вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 10, соответственно, или

вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO. 6 и SEQ ID NO. 11, соответственно, или

вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO. 7 и SEQ ID NO. 12, соответственно.

[0030] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 31 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 32,

или

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 33 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 34,

или

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 35 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 36,

или

5 тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 37 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 38,

или

10 тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 39 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 40.

[0031] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

15 переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 17 (H-CDR3), или

20 переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 14 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 17 (H-CDR3), или

25 переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16 (H-CDR3); или

30 переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16 (H-CDR3); или

переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16 (H-CDR3);

и

каркасную область тяжелой цепи, содержащую одну - четыре аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 41 (H-FR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 42 (H-FR2); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 43 (H-FR3); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 44 (H-FR4).

[0032] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 19 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 22 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3), или

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 19 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 22 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3), или

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 20 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 23 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3), или

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 21 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 23 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 25 (L-CDR3), или

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 20 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 22 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3);

и

каркасную область легкой цепи, содержащую одну - четыре аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 45 (L-FR1); аминокислотную

последовательность SEQ ID NO. 46 (L-FR2); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 47 (L-FR3); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 48 (L-FR4).

[0033] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 117-148 карбокси-концевой области фибриноген-подобного домена (FLD) ANGPT2 человека с последовательностью SEQ ID NO. 50.

[0034] В другом варианте осуществления, изобретение относится к ANGPT2 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывается с SEQ ID NO: 51.

[0035] В одном варианте осуществления, антитело к ANGPT2 представляет собой гуманизированное антитело к ANGPT2.

[0036] В другом варианте осуществления, антитело к ANGPT2 представляет собой химерное антитело к ANGPT2.

[0037] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в медицине.

[0038] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения для лечения заболеваний почек.

[0039] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения для лечения заболеваний печени.

[0040] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

[0041] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию, содержащую антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент вводят с помощью парентерального пути, внутривенного пути, интравитреального пути или подкожного пути введения.

[0042] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащий (е) последовательность, кодирующую легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0043] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает экспрессионный вектор, содержащий выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующий (е) легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0044] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает вирусный вектор, содержащий выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующий (е) легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0045] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает клетку-хозяина, содержащую экспрессионный вектор или выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующий (е) легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0046] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает способ получения антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий:

получение клетки-хозяина, содержащей экспрессионный вектор или выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующий (е) легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и культивирование клетки-хозяина.

[0047] В одном варианте осуществления, способ получения антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента дополнительно включает восстановление и очистку антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента.

5 **[0048]** В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к выделенному (ым) полинуклеотиду или полинуклеотидам, содержащему (им):

последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 31 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 3; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 32 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 8, или

10 выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащий (е) последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 33 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 4; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 34 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 9,

или
20 выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащий (е) последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 35 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 5; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 36 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO:

25 10, или

выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащий (е) последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 37 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 6; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 38 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 11,

30 или

выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащий (е) последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 39 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 7; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 40 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 12.

[0049] Неограничивающие примеры заболеваний, нарушений или состояний, которые могут быть облегчены с помощью антител к ANGPT2 согласно изобретению, включают гипертрофию сердца, инфаркт миокарда, ишемию, ишемическое реперфузионное повреждение, удар гипертензию, легочную артериальную гипертензию, идиопатическую легочную артериальную гипертензию, нарушения мозговой деятельности, индуцированные травмой, астму, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, гипертензию, вызванной беременностью и преэклампсией, сепсис, тяжёлый сепсис, септический шок, неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз, болезнь минимальных изменений, фокально-сегментарный гломерулосклероз (FSGS), нефротический синдром, диабетическое заболевание почек (DKD), хроническую болезнь почек (CKD), диабетическую почечную недостаточность, терминальную стадию почечной недостаточности, ишемию или ишемическое реперфузионное повреждение, злокачественное новообразование, гепатоцеллюлярную карциному, идиопатический фиброз лёгких (IPF), эмфизему, острое повреждение лёгких (ALI), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), тяжёлый острый респираторный синдром (SARS), ближневосточный респираторный синдром (MERS), повышенную проницаемость сосудов (и ассоциированные нарушения), острое повреждение почек (AKI), почечно-клеточную карциному, сердечную недостаточность, волчаночный нефрит, синдром Рейно, панкреатит, заболевание периферических артерий, врождённое заболевание сердца, вирус Денге, малярию, хантавирус, отек, регенерацию, волчанку, интерстициальное заболевание легких, склеродерму, ретинопатии, диабетическую нефропатию, портальную гипертензию, рост варикозов и пересадку печени.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0050] На Фигурах 1А и 1В представлены результаты (исследования в двух повторях) ангиопоэтина 2 комплементзависимой клеточно-опосредованной

цитотоксичности (CDC), указывающие цитотоксичность ANGPT2-opt-13 ($\square$ -), аналога REGN910 (nesvacumab) ($\triangle$ -), аналога MEDI3617 ($\diamond$ -), и LC06 ($\ast$ -).

[0051] На Фигуре 2 представлено картирование эпитопов к FLD домену антител к ANGPT2 (SEQ ID NO: 59): химерная лидерная CL-209881, ANGPT2-opt-13, аналог nesvacumab, аналог MEDI3617, и LC06. Сайты специфического связывания для каждой молекулы с внеклеточным FLD доменом ANGPT2 человека (SEQ ID NO: 59) выделены темно-серым.

[0052] На Фигурах 3A-3F представлены результаты для ANGPT2 блокирующего анализа для ANGPT2-opt-1 (Фигура 3A), ANGPT2-opt-2 (Фигура 3B), ANGPT2-opt-13 (Фигура 3C), ANGPT2-opt-19 (Фигура 3D), ANGPT2-opt-31 (Фигура 3E), химерной лидерной CL-209881 (Фигура 3F), и аналога nesvacumab (Фигура 3G).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0053] Общая структура антител или иммуноглобулина хорошо известна специалистам в данной области, эти молекулы представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, как правило, с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью с помощью одной дисульфидной связи с образованием гетеродимера, и гетеротримерная молекула образуется посредством ковалентной дисульфидной связи между двумя идентичными тяжелыми цепями гетеродимеров. Хотя легкие и тяжелые цепи связаны с помощью одной дисульфидной связи, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями варьируется в зависимости от изотипа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь имеет также равномерно распределенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет аминоконцевую переменную область (VH = переменная тяжелая цепь), за которой расположены три или четыре константных домена (CH1, CH2, CH3 и CH4), а также шарнирный участок между CH1 и CH2. Каждая легкая цепь имеет две области, аминоконцевую переменную область (VL = переменная легкая цепь) и карбоксиконцевой константный домен (CL). VL-область нековалентно связана с VH-областью, а CL-домен, как правило, ковалентно связанный с CH1-доменом через дисульфидную связь. Вероятно, определенные аминокислотные

остатки образуют поверхность раздела между переменными областями легких и тяжелых цепей (Чотиа и др., J. Mol. Biol. 186, 1985, сс. 651-663).

[0054] Определенные участки в переменных областях значительно различаются у различных антител, т.е. они являются «гиперпеременными».

5 Эти гиперпеременные участки содержат остатки, которые непосредственно участвуют в связывании и определяют специфичность каждого конкретного антитела в отношении специфической для него антигенной детерминанты. Гиперпеременность в переменных областях, как легкой цепи, так и тяжелой цепи, концентрируется в трех сегментах, которые обозначают как определяющие комплементарность участки (гиперпеременные участки) (CDR) или гиперпеременные петли (HVL). CDR определяют путем сравнения последовательностей согласно методу, описанному у Кэбот и др., в: Последовательности of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991, а HVL структурно определяют на основе трехмерной структуры переменной области согласно методу, описанному у Чотиа and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917. Если эти два метода приводят к некоторым различиям при идентификации CDR, то предпочтительным является определение на основе структуры. Согласно номенклатуре Кэбота CDR-L1 расположен примерно на остатках 24-34, CDR-L2 примерно на остатках 50-56 и CDR-L3 примерно на остатках 89-97 в переменной области легкой цепи; CDR-H1 расположен примерно на остатках 31-35, CDR-H2 примерно на остатках 50-65 и CDR-H3 примерно на остатках 95-102 в переменной области тяжелой цепи. Таким образом, CDR1, CDR2, CDR3 тяжелых и легких цепей определяют уникальные и функциональные свойства, специфические для данного антитела.

[0055] Три CDR в каждой из тяжелых и легких цепей разделены каркасными участками (FR), которые содержат последовательности, в меньшей степени имеющие тенденцию к переменности. Начиная с аминоконца по направлению к карбоксиконцу переменных областей тяжелых и легких цепей FR и CDR упорядочены следующим образом: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В значительной степени β -складчатая конформация FR позволяет CDR в каждой из цепей находиться в непосредственной близости друг с другом, а также с CDR из другой цепи. Полученная конформация присуща антигенсвязывающему центру (см. Кэбот и др., NIH Publ. № 91-3242, т. I, 1991,

сс. 647-669), хотя не является необходимым условие, чтобы все остатки CDR непосредственно участвовали в связывании антигена.

[0056] Остатки FR и константные домены Ig не вовлечены непосредственно в связывание антигена, но участвуют в связанной с антигеном и/или опосредуемой антигеном эффекторной функции. Некоторые остатки FR, вероятно, оказывают выраженное воздействие на связывание антигена по меньшей мере тремя путями: путем нековалентного связывания непосредственно с эпитопом, путем взаимодействия с одним или несколькими остатками CDR и путем влияния на поверхность раздела между тяжелыми и легкими цепями. Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антигена, но опосредуют различные эффекторные функции Ig, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и антителозависимом клеточном фагоцитозе (ADCP).

[0057] Легкие цепи иммуноглобулинов позвоночных животных относят к одному или двух четко различимых классов, каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константного домена. Для сравнения, тяжелые цепи иммуноглобулинов млекопитающих относятся к одному из пяти основных классов с учетом последовательности константных доменов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG и IgA дополнительно подразделяют на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, соответственно. Константные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначают как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации классов нативных иммуноглобулинов хорошо известны.

[0058] Термины, «антитело», «антитело к ангиопоэтину 2», «антитело к ANGPT2», «гуманизированное антитело к ANGPT2», и «вариант гуманизированного антитела к ANGPT2» применяют в наиболее широком смысле, и они относятся, в частности, к моноклональным антителам (включая полноразмерные моноклональные антитела), мультиспецифическим антителам (например, биспецифическим антителам), антителам с незначительными модификациями, такими как N- или C-концевые усечения, и фрагментам антител, таким как вариабельные области и другие участки антител, которые обладают требуемой биологической активностью, например, способностью связываться с ANGPT2. Термин «моноклональное антитело» (mAb) относится к

антителу из популяции практически гомогенных антител; т.е. индивидуальные антитела в указанной популяции являются идентичными за исключением встречающихся в естественных условиях мутаций, которые могут присутствовать в очень небольших количествах.

5 **[0059]** Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, их мишенью является индивидуальная антигенная детерминанта, «эпитоп». Таким образом, прилагательное «моноклональные» является отличительным признаком практически гомогенной популяции антител, мишенью которых является идентичный эпитоп, и понятие не ограничено требованием к получению антител
10 с помощью какого-либо конкретного метода. Должно быть очевидно, что моноклональные антитела можно получать с помощью любой техники или методологии, известной в данной области; включая, например, метод гибридом (Kohler и др., Nature 256, 1975, с. 495), или методы рекомбинантной ДНК, известные в данной области (см., например, US 4816567), или методы выделения
15 моноклональных полученных с помощью рекомбинантной ДНК антител с использованием фаговых библиотек антител, которые описаны у Clackson и др., Nature 352, 1991, сс. 624-628 и у Marks и др., J. Mol. Biol. 222, 1991, сс. 581-597.

[0060] Химерные антитела состоят из переменных областей тяжелой и легкой цепи антител из одного вида (например, из млекопитающего кроме
20 человека, такого как мышь) и константных областей легкой и тяжелой цепи антитела из других видов (например, человека), и их можно получать путем соединения последовательностей ДНК, кодирующих переменные области антитела из первого вида (например, мыши), с последовательностями ДНК константных областей антитела из второго вида (например, человека), и
25 трансформации хозяина экспрессионным вектором, содержащим связанные последовательности, что позволяет хозяину продуцировать химерное антитело. В альтернативном варианте химерное антитело может также представлять собой антитело, в котором одна или несколько областей или доменов тяжелой и/или легкой цепи идентичны, гомологичны или являются вариантом соответствующей
30 последовательности в моноклональном антителе из другого класса или изотипа иммуноглобулина или из консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии. Химерные антитела могут включать фрагменты указанных антител при условии, что фрагмент антитела обладает требуемой биологической активностью родительского антитела, например,

способностью связываться с одним и тем же эпитопом (см., например, US 4816567; и Morrison и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 6851-6855).

[0061] Термины «фрагмент антитела», «антигенсвязывающий фрагмент», «фрагмент антитела к ANGPT2», «фрагмент гуманизированного антитела к ANGPT2», «фрагмент варианта гуманизированного антитела к ANGPT2» относятся к части полноразмерное антитело к ANGPT2, в котором сохраняется переменная область или ее функциональная способность, например, специфичность связывания с эпитопом ANGPT2. Примерами фрагментов антител являются, но не ограничиваясь только ими, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv и scFv-Fc фрагмент, диатело, линейное антитело, одноцепочечное антитело, минитело, диатело, образованное из фрагментов антител, и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0062] Полноразмерные антитела можно обрабатывать ферментами, такими как папаин или пепсин, с получением требуемых фрагментов антител.

Расщепление папаином применяют для получения двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, которые называют «Fab»-фрагментами, каждый с одним антигенсвязывающим центром, при этом оставшуюся часть обозначают как «Fc»-фрагмент. Fab-фрагмент содержит также константный домен легкой цепи и C_{H1}-домен тяжелой цепи. После обработки пепсином получают F(ab')₂-фрагмент, который несет два антигенсвязывающих центра и все еще сохраняет способность к перекрестному сшиванию с антигеном.

[0063] Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов присутствием дополнительных остатков, включая один или несколько остатков цистеина из шарнирной области антитела на С-конце C_{H1}-домена. F(ab')₂-фрагменты антител представляют собой пары Fab'-фрагментов, связанных с помощью остатков цистеина в шарнирной области. Известны другие химические сочетания фрагментов антител.

[0064] «Fv»-фрагмент содержит полный антиген-распознающий и антиген-связывающий центр, состоящий из димера, включающего переменную область одной тяжелой и одной легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В этой конфигурации три CDR каждой переменной области взаимодействуют с определенным антигенсвязывающим центром на поверхности димера V_H-V_L. В целом, шесть CDR обуславливают специфичность антитела в отношении связывания антигена.

[0065] «Одноцепочечный Fv» или «scFv»-фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный Fv-вариант, содержащий V_H- и V_L-области антитела, при этом области присутствуют в одной полипептидной цепи. Одноцепочечный Fv обладает способностью распознавать антиген и связываться с ним. Полипептид scFv необязательно может содержать также полипептидный линкер, расположенный между V_H- и V_L-областями для облегчения образования трехмерной структуры, требуемой для связывания антигена с помощью scFv (см., например, Pluckthun, в: The Pharmacology of monoclonal Antibodies, т. 113, под ред. Rosenberg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1991, сс. 269-315).

[0066] Другие обладающие способностью к распознаванию фрагменты антител включают фрагменты, которые содержат пару расположенных в виде тандема Fd-сегментов (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}), образующих пару антигенсвязывающих участков. Указанные «линейные антитела» могут быть биспецифическими или моноспецифическими, что описано, например, у Zapata и др., Protein Eng. 8(10), 1995, сс. 1057-1062.

[0067] Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела представляет собой специфический тип химерного антитела, которое включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его фрагмента, который обладает способностью связываться с предварительно определенным антигеном и который содержит один или несколько FR, который(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, практически соответствующую последовательности человеческого иммуноглобулина, и один или несколько CDR, который(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, которая практически соответствует аминокислотной последовательности нечеловеческого иммуноглобулина. Указанную нечеловеческую аминокислотную последовательность, которую часто обозначают как «импортная» последовательность, как правило, получают из «импортной» области антитела, в частности, варибельной области. В целом, гуманизированное антитело включает по меньшей мере CDR или HVL нечеловеческого антитела, встроенные между FR варибельного домена человеческой тяжелой или легкой цепи.

[0068] В настоящем изобретении описаны специфические гуманизированные антитела к ANGPT2, которые содержат CDR, имеющие

происхождение из мышиногo лидерного CL-209881, встроенные между FR последовательностей вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи зародышевой линии человека.

[0069] В одном аспекте, гуманизированное антитело к ANGPT2 содержит

5 по существу все из по меньшей мере одного, и типично двух, вариабельных доменов (таких, например, как входящие в Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, и Fv фрагменты), в которых все или по существу все из CDR соответствуют CDR нечеловеческого иммуноглобулина, и согласно настоящему изобретению, CDR представляют собой мышинные последовательности химерного лидерного CL-
10 209881, и FR представляют собой FR, которые имеют консенсусную последовательность или последовательность зародышевой линии иммуноглобулина человека. В другом аспекте, гуманизированное антитело к ANGPT2 также включает по меньшей мере часть Fc области иммуноглобулина, типично, такую часть иммуноглобулина человека. Как правило, антитело должно
15 содержать как легкую цепь, так и по меньшей мере вариабельный домен тяжелой цепи. Антитело также может включать одну или несколько C_{H1}, шарнирную, C_{H2}, C_{H3}, и/или C_{H4} областей тяжелой цепи, если это является подходящим.

[0070] Гуманизированное антитело к ANGPT2 может быть выбрано из

любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого
20 изотипа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Например, константный домен может представлять собой комплементсвязывающий константный домен, где является желательным, чтобы гуманизированное антитело проявляло цитотоксическую активность, и изотип типично представлял собой IgG₁. В тех случаях, когда такая цитотоксическая активность не является желательной, то
25 константный домен может представлять собой другой изотип, например, IgG₂. Альтернативное гуманизированное антитело к ANGPT2 может содержать последовательности из более чем одного класса или изотипа иммуноглобулинов, и выбор конкретных константных доменов для оптимизации требуемых эффекторных функций находится в компетенции обычного специалиста в данной
30 области.

[0071] FR и CDR или HVL гуманизированного антитела к ANGPT2 не обязательно должны точно соответствовать родительским последовательностям. Например, один или несколько остатков в импортном CDR или HVL или в консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии

FR можно изменять (например, посредством мутагенеза) путем замены, инсерции или делеции, в результате чего полученный аминокислотный остаток становится не идентичным исходному остатку в соответствующем положении любой родительской последовательности, но, тем не менее, антитело сохраняет функцию, такую как способность связываться с ANGPT2. Указанное изменение, как правило, не должно быть обширным и должно представлять собой консервативные изменения. Как правило, по меньшей мере 75% остатков, чаще по меньшей мере на 90% и наиболее часто более 95% или более 98% или более 99%, гуманизированного антитела должно соответствовать остаткам родительской консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии FR и импортных последовательностей CDR.

[0072] Остатки иммуноглобулина, которые влияют на поверхность раздела между вариабельными областями тяжелой и легкой цепи («поверхность раздела V_L - V_H »), представляют собой остатки, которые влияют на близость или ориентацию двух цепей относительно друг друга. Конкретными остатками, которые могут участвовать во взаимодействиях между цепями, являются остатки V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 и 98 и остатки V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 и 103 (согласно системе нумерации, предложенной Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). В US 6407213 обсуждается также, что в указанном взаимодействии могут участвовать такие остатки как остатки V_L 43 и 85 и остатки V_H 43 и 60. Хотя указанные остатки указаны только для человеческого IgG, их можно рассматривать и для других видов. Важные остатки антитела, которые, как ожидается, могут участвовать во взаимодействиях между цепями, отбирают для замены в консенсусной последовательности.

[0073] Термины «консенсусная последовательность» и «консенсусное антитело» относятся к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в каждом положении во всех иммуноглобулинах любого класса, изотипа или в любой субъединичной структуре, например, вариабельной области человеческого иммуноглобулина. Консенсусная последовательность может базироваться на иммуноглобулинах конкретных видов или множества видов. Под «консенсусной/консенсусным» последовательностью, структурой или антителом подразумевают консенсусную человеческую последовательность, указанную в конкретных вариантах

осуществления изобретения, и понятие относится к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее часто встречающиеся остатки в каждом положении во всех человеческих иммуноглобулинах конкретного класса, изотипа или субъединичной структуры. Таким образом, консенсусная последовательность содержит аминокислотную последовательность, которая имеет в каждом положении аминокислоту, которая присутствует в одном или нескольких известных иммуноглобулинах, но которая может не представлять собой точную копию полной аминокислотной последовательности любого индивидуального иммуноглобулина. Вариабельную область консенсусной последовательности не получают из какого-либо встречающегося в естественных условиях антитела или иммуноглобулина (Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991) и его вариантов. Консенсусные последовательности FR тяжелой и легкой цепи и их варианты представляют собой ценные последовательности для получения гуманизированных антител к ANGPT2 (см., например, US 6037454 и 6054297).

[0074] Последовательности зародышевой линии человека присутствуют в естественных условиях в популяции человеческих антител. Комбинация этих генов зародышевой линии создает разнообразие антител. Последовательности зародышевой линии антитела легкой цепи антитела получают из консервативных человеческих ν -генов и j -генов зародышевой линии каппа или лямбда. Аналогично этому последовательности тяжелой цепи получают из ν -, d - и j -генов зародышевой линии (LeFranc M-P и LeFranc G, «*The Immunoglobulin Facts Book*», изд-во Academic Press, 2001).

[0075] «Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое идентифицировано и отделено и/или очищено от компонента его естественного окружения. Загрязняющие компоненты естественного окружения антитела представляют собой субстанции, которые могут влиять на диагностическое или терапевтическое применение антитела и могут представлять собой ферменты, гормоны или другие белковые или небелковые растворенные вещества. В одном из объектов изобретения выделенное антитело должно представлять собой антитело, очищенное до степени, превышающей 95 мас. %.

[0076] Выделенное антитело представляет собой антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток, в которых оно продуцировано, если в нем не

присутствует ни один компонент естественного окружения антитела. Однако, как правило, выделенное антитело получают с помощью по меньшей мере одной стадии очистки, во время которой удаляют рекомбинантный клеточный материал.

5 **[0077]** Понятие «характеристика антитела» относится к факторам/свойствам, которые описывают распознавание антителом антигена или эффективность антитела *in vivo*. Изменения в аминокислотной последовательности антитела могут влиять на свойства антитела, такие как фолдинг, и могут влиять на физические факторы, такие как начальная скорость
10 связывания антитела с антигеном (k_a), константа диссоциации антитела от антигена (k_d), константа аффинности антитела к антигену (K_d), конформация антитела, стабильность белка и время полужизни антитела.

[0078] Термин «нейтрализующее антитело» или «блокирующее антитело» относится к антителу, связывание которого с ANGPT2 блокирует
15 взаимодействие между ANGPT2 и его рецептором (Tie-2) и/или приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической функции ANGPT2. Следует принять во внимание, что ингибирование, вызываемое антителом, нейтрализующим или блокирующим ANGPT2, не обязательно должно быть полным, если его можно обнаружить с помощью соответствующего анализа.
20 Типичные анализы для обнаружения ингибирования описаны в настоящей заявке или известны в данной области техники.

[0079] В контексте настоящего описания понятия «идентичный» или «процент идентичности» касательно двух или большего количества нуклеотидных или полипептидных последовательностей относится к двум или
25 большему количеству последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия. Для определения процента идентичности последовательности выравнивают для оптимального сравнения (например,
30 можно интродуцировать брешы в последовательность первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности для оптимального сравнительного анализа первичной структуры со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях

нуклеотидов. Когда в положении в первой последовательности находится такой же аминокислотный остаток или нуклеотид, что и в соответствующем положении во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в указанном положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от количества идентичных положений в последовательностях (т.е. % идентичности = количество идентичных положений/общее количество положений (например, перекрывающихся положений)×100). В некоторых вариантах осуществления изобретения две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после интродукции при необходимости брешей в последовательности (например, исключая дополнительную последовательность, простирающуюся за последовательностями, подлежащими сравнению). Например, когда сравнивают последовательности переменных областей, то лидерные и/или последовательности константных доменов не рассматриваются. При сравнении последовательностей двух последовательностей, «соответствующий» CDR относится к CDR, расположенному в одинаковом положении в обеих последовательностях (например, CDR-H1 каждой последовательности).

[0080] Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма. Предпочтительным примером математического алгоритма, который можно применять для сравнения двух последовательностей, является (но не ограничиваясь только ими) алгоритм Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1990, сс. 2264-2268, модифицированный согласно описанному у Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 5873-5877. Указанный алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, описанные у Altschul и др., J. Mol. Biol. 215, 1990, сс. 403-410. Анализ нуклеотидов с помощью BLAST можно осуществлять с помощью программы NBLAST, в которой балл = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей представляющей интерес белок. Анализ белков с помощью BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, в которой балл = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющему интерес белку. Для осуществления сравнительных анализов первичной структуры, включающей брешу, можно применять программу Gapped BLAST, описанную у Altschul и др.,

Nucleic Acids, 25, 1997, сс. 3389-3402. В другом варианте можно применять PSI-Blast для осуществления итерационного поиска, позволяющего определять отдаленные взаимосвязи между молекулами (Id.). При применении программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно применять задаваемые по умолчанию параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным примером (но, не ограничиваясь только им) математического алгоритма, который можно применять для сравнения последовательностей, является алгоритм, описанный у Myers и Miller, CABIOS, 1989. Указанный алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ для сравнительного анализа первичной структуры последовательностей GCG. Когда программу ALIGN применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, то можно применять таблицу взвешенных остатков PAM120, штраф за длину бреши 12 и штраф за брешь 4. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательностей известны в данной области и включают ADVANCE и ADAM, описанные у Torellis и Robotti, Comput. Appl. Biosci. 10, 1994, сс. 3-5; и FASTA, описанный у Pearson и Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, сс. 2444-2448. В программе FASTA параметр ktup обозначает контрольный параметр, который задает чувствительность и скорость поиска. Если ktup = 2, то сходные области в двух подлежащих сравнению последовательностях выявляют путем просмотра пар выравненных остатков; если ktup = 1, то оценивают индивидуальные выравненные аминокислоты. Для белковых последовательностей можно задавать значение ktup, равное 2 или 1, а для последовательностей ДНК значения в пределах от 1 до 6. В альтернативном варианте сравнительный анализ первичной структуры белковых последовательностей можно осуществлять с помощью алгоритма CLUSTAL W, описанного у Higgins и др., Methods Enzymol. 266, 1996, сс. 383-402.

[0081] Последовательность нуклеиновой кислоты «функционально связана», если она расположена в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, предпоследовательность нуклеиновой кислоты или секреторная лидерная последовательность функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если она экспрессируется в виде белка-предшественника, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с

кодирующей последовательностью, если он оказывает влияние на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он позиционирован таким образом, что облегчает трансляцию. В целом, "функционально связана" обозначает, что последовательности ДНК, которые связаны, являются соприкасающимися, и, в случае секреторной лидерной последовательности, соприкасаются и в рамке считывания. Однако энхансеры не обязательно являются соприкасающимися. Связывание может осуществляться путем лигирования в подходящих сайтах рестрикции. Если такие сайты не существуют, то можно использовать синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры.

[0082] Как используется в настоящей заявке, выражения «клетка», «клеточная линия» и «культура клеток» используются взаимозаменяемо и все такие обозначения охватывают их потомство. Таким образом, «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичные рассматриваемые клетки и культуры, имеющие происхождение из них, независимо от количества переносов.

[0083] Понятие «млекопитающее», подлежащее лечению, относится к любому животному, которое принадлежит к классу млекопитающих, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также живущих в зоопарке животных, предназначенных для спорта или комнатных животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.д. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека.

[0084] «Нарушение», как используется в настоящей заявке, представляет собой любое состояние, которое будет получать преимущество от лечения с применением гуманизированного антитела к ANGPT2, описанного в настоящей заявке. Оно включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые вызывают предрасположенность млекопитающего к указанному нарушению.

[0085] Как используется в настоящей заявке, термин «нарушение, связанное с ANGPT2,» или «заболевание, связанное с ANGPT2,» относится к состоянию, при котором показана модификация или активация клеток, экспрессирующих ANGPT2. Нарушение, связанное с ANGPT2, включает заболевания и нарушения, такие как возрастная дегенерация жёлтого пятна, географическая атрофия, диабетическая ретинопатия, диабетический отёк

жёлтого пятна, пигментная дистрофия сетчатки, наследственная дистрофия сетчатки, наследственная макулодистрофия, миопическая дегенерация, окклюзии вены сетчатки, окклюзии артерии сетчатки, эндофтальмит, увеит, кистозный макулярный отёк, хороидальная неоваскулярная мембрана вследствие

5 любого из заболеваний сетчатки, оптические нейропатии, глаукома, отслойка сетчатки, токсическая ретинопатия, лучевая ретинопатия, и травматическая ретинопатия, а также продромальная и от легкой до умеренной болезнь Альцгеймера, задержка прогрессирования заболевания у пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, большое депрессивное

10 расстройство, шизофрения, когнитивное нарушение, связанное с шизофренией, предотвращение первого приступа психоза у индивидуумов с ослабленным психозным синдромом, предотвращение повторения у пациентов с шизофренией, терапевтически резистентная депрессия, и метаболические заболевания, такие как гиперфагия, ожирение или метаболический синдром.

15 **[0086]** Нарушение, связанное с ANGPT2, также включает гипертрофию сердца, инфаркт миокарда, ишемию, ишемическое реперфузионное повреждение, удар гипертензию, легочную артериальную гипертензию, идиопатическую легочную артериальную гипертензию, нарушения мозговой деятельности, индуцированные травмой, астму, хроническое обструктивное

20 заболевание легких (ХОЗЛ), ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, гипертензию, вызванной беременностью и преэклампсией, сепсис, тяжёлый сепсис, септический шок, неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз, болезнь минимальных изменений, фокально-сегментарный гломерулосклероз (FSGS), нефротический синдром,

25 диабетическое заболевание почек (DKD), хроническую болезнь почек (CKD), диабетическую почечную недостаточность, терминальную стадию почечной недостаточности, ишемию или ишемическое реперфузионное повреждение, злокачественное новообразование, гепатоцеллюлярную карциному, идиопатический фиброз лёгких (IPF), эмфизему, острое повреждение лёгких

30 (ALI), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), тяжёлый острый респираторный синдром (SARS), ближневосточный респираторный синдром (MERS), повышенную проницаемость сосудов (и ассоциированные нарушения), острое повреждение почек, почечно-клеточную карциному, сердечную недостаточность, волчаночный нефрит, синдром Рейно, панкреатит, заболевание

периферических артерий, врождённое заболевание сердца, вирус Денге, малярию, хантавирус, отек, регенерацию, волчанку, интерстициальное заболевание легких, склеродерму, ретинопатии, диабетическую нефропатию, портальную гипертензию, рост варикозов и пересадку печени.

5 **[0087]** Термин «интравитреальная инъекция» имеет общепринятое значение в данной области техники и относится к интродукции антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента в стекловидное тело пациента.

10 **[0088]** Термин «специфически связывает» или подобное, обозначает, что антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который относительно стабильный в физиологических условиях. Способы определения, являются ли две молекулы специфически связанными, описаны в настоящей заявке или известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный
15 резонанс, и другие. В одном варианте осуществления, специфическое связывание характеризуется K_D приблизительно 1×10^{-8} М или меньше в соответствии со Способом аффинного связывания, описанном в разделе Примеры в настоящей заявке. В другом варианте осуществления, специфическое связывание характеризуется K_D приблизительно 1×10^{-9} М или меньше в
20 соответствии со Способом аффинного связывания, описанном в разделе Примеры в настоящей заявке. Тем не менее, выделенное антитело, которое специфически связывает Ang-2 человека, может перекрестно реагировать с другими антигенами, такими как молекулы ANGPT2-2 из других видов. Кроме того, выделенное антитело может по существу не содержать других клеточных
25 материалов и/или химических веществ.

[0089] Термин "подкожное введение" относится к интродукции антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента под кожу больного животного или человека, предпочтительно в карман между кожей и низлежащей тканью, путем относительно медленного пролонгированного введения из содержащего
30 лекарственное средство резервуара. Пощипывание или оттягивание кожи вверх и от низлежащей ткани может создавать карман.

[0090] Понятие «подкожная инфузия» относится к интродукции лекарственного средства под кожу больного животного или человека, предпочтительно в карман между кожей и низлежащей тканью, путем

относительно медленного пролонгированного введения из содержащего лекарственное средство резервуара в течение периода времени, составляющего (но, не ограничиваясь только указанным) 30 мин или менее или 90 мин или менее. Необязательно инфузию можно осуществлять путем подкожной имплантации насоса для введения лекарственного средства, имплантированного под кожу больного животного или человека, при этом насос обеспечивает введение лекарственного средства в предварительно определенном количестве в течение предварительно определенного периода времени, составляющего 30 мин, 90 мин или периода времени, соответствующего продолжительности схемы лечения.

[0091] Понятие «подкожный болюс» относится к введению лекарственного средства под кожу больного животного или человека, при этом продолжительность введения лекарственного средства в виде болюса составляет менее примерно 15 мин; в другом объекте изобретения менее 5 мин, а еще в одном объекте изобретения в течение менее 60 с. В следующем объекте изобретения введение осуществляют в карман между кожей и низлежащей тканью, где карман можно создавать путем пощипывания или оттягивания кожи вверх и от низлежащей ткани.

[0092] Термин "терапевтически эффективное количество" используется по отношению к количеству антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента, при использовании которого происходит ослабление или облегчение одного или нескольких симптомов нарушения, подлежащего лечению. Действующее вещество применяют таким образом, что в указанном количестве оно оказывало благоприятное действие на пациента. В одном аспекте, терапевтически эффективное количество имеет нейрозащитный или нейрорегенеративный эффект. В другом аспекте, терапевтически эффективное количество относится к целевой концентрации в сыворотке пациента, при которой оно проявляется как эффективное, например, в отношении замедления прогрессирования заболевания. Эффективность можно оценивать общепринятыми путями в зависимости от подлежащего лечению состояния. Например, эффективность может быть измерена путем определения частоты ответов, например, восстановление зрения или путем оценки времени задержки до прогрессирования заболевания.

[0093] Термины "лечение" и "терапия" и подобные, как используются в настоящей заявке, относятся к терапевтическим, а также профилактическим или подавляющим мероприятиям в отношении заболевания или нарушения, которые приводят к любому клинически важному или благоприятному действию, включая (но, не ограничиваясь только ими) облегчение или ослабление одного или нескольких симптомов, регресс, замедление или прекращение развития заболевания или нарушения. Таким образом, например, под понятие «лечение» подпадает введение антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента до или после начала проявления симптома заболевания или нарушения, что приводит к предупреждению или устранению одного или нескольких признаков заболевания или нарушения. В другом примере понятие относится к введению антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента после клинического проявления болезни для борьбы с симптомами болезни. Кроме того, в контексте настоящего описания понятие «лечение» или «терапия» относятся к введению антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента после возникновения и после развития клинических симптомов, где введение оказывает воздействие на клинические параметры заболевания или нарушения, такие как степень повреждения ткани или количество и распространение метастазов, вне зависимости от того, приводит или нет лечение к облегчению заболевания. Кроме того, если применение композиций, предлагаемых в изобретении, либо индивидуально, либо в сочетании с другим терапевтическим средством купирует или облегчает по меньшей мере один из симптомов подлежащего лечению нарушения по сравнению с указанным симптомом без применения содержащей композиции антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента, результат следует рассматривать как эффективное лечение требуемого нарушения вне зависимости от того, происходит или нет облегчение всех симптомов нарушения.

[0094] Термин «листовка-вкладыш в упаковке» относится к инструкциям, которые принято включать в предназначенные для продажи упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, методах применения, введения, противопоказаниях и/или мерах предосторожности при применении указанных терапевтических продуктов.

[0095] Антитела

[0096] Описанные и раскрытые в настоящей заявке антитела представляют собой антитела к ANGPT2, в особенности, гуманизированные антитела к ANGPT2, а также композиции и изделия, содержащие антитела к ANGPT2 согласно настоящему изобретению. Также описаны антигенсвязывающие фрагменты антител к ANGPT2. Антитела к ANGPT2 и их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для лечения различных заболеваний или нарушений, которые характеризуются уменьшенной активностью ANGPT2 пути. Антитело к ANGPT2 и его антигенсвязывающий фрагмент каждый включает по меньшей мере часть, которая специфически распознает ANGPT2 эпитоп.

[0097] При исходной характеристике, было отобрано химерное лидерное CL-209881 к ANGPT2 на основании его намного лучшей эффективности функционирования антитела. Создавали библиотеку вариантов путем помещения CDR мышиной лидерной последовательности в FR консенсусных переменных доменов тяжелой и легкой цепи человека, а также, путем конструирования FR с различными изменениями.

[0098] Это привело к получению 33 последовательностей, которые подвергали дальнейшей оптимизации и подверженности-фиксированию, получая 6 конечных кандидатов с улучшенными свойствами, как описано в настоящей заявке. Последовательности антитела согласно изобретению представлены ниже:

[0099] VH последовательности

[00100] CL-209881_VH (химерная лидерная), переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 1

QVQLKQSGAELVPGSSVKISCRASGYIFIDYFINWVKQRPGQGLEWIGKIGPGS
GSSSSNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREAFDYDGDYYG
MAYWGQGTSTVTVSS

[00101] ANGPT2-opt-1 (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 3

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVRQAPGQGLEWMGKIGP
GSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREAFDYEGDY
YGMAYWGQGTSLVTVSS

[00102] ANGPT2-opt-2 (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 4

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIEYFINWVRQAPGQGLEWMGKIGP
GSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAREAFDYEGDY
YGMAYWGQGTLVTVSS

[00103] ANGPT2-opt-13 (гуманизированная) переменная тяжелая цепь,
5 SEQ ID NO: 5

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVRQAPGQGLEWMGKIGP
GSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAREAFDYDGDY
YGMAYWGQGTLVTVSS

[00104] ANGPT2-opt-19 (гуманизированная) переменная тяжелая цепь,
10 SEQ ID NO: 6

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVRQAPGQGLEWMGKIGP
GSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAREAFDYDGDY
YGMAYWGQGTLVTVSS

[00105] ANGPT2-opt-31 (гуманизированная) переменная тяжелая цепь,
15 SEQ ID NO: 7

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVRQAPGQGLEWMGKIGP
GSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAREAFDYDGDY
YGMAYWGQGTLVTVSS

[00106] VL ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

20 **[00107]** CL-209881_VL (химерная лидерная), переменная легкая цепь,
SEQ ID NO: 2

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNFLAWYQQKPGQPPKLLI
YGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTITSVQAEDLAVYYCQNDHSYPITFGSGTK
LEIK

25 **[00108]** ANGPT2-opt-1 (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ
ID NO: 8

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLLASGNQKNFLAWYQQKPGQAPRLLI
YGASTRESGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKL
EIK

30 **[00109]** ANGPT2-opt-2 (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ
ID NO: 9

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLLASGNQKNFLAWYQQKPGQAPRLLI
YGASTRESGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKL
EIK

[00110] ANGPT2-opt-13 (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 10

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLSSGNQKSFLAWYQQKPGQAPRLLIY
GASTRETGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKLE

5 IK

[00111] ANGPT2-opt-19 (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 11

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVLSSGNQKSFLAWYQQKPGQAPRLLIY
GASTRETGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQDHSYPITFGQGTKLE

10 IK

[00112] ANGPT2-opt-31 (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 12

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLSSGNQKSFLAWYQQKPGQAPRLLIY
GASTRESGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKLEI

15 K

[00113] Подчеркнутые части последовательностей, описанных выше, соответствовали CDR областям переменных областей легкой и тяжелой цепи.

[00114] Гуманизированные антитела к ANGPT2 согласно настоящему изобретению представляют собой антитела, которые имеют последовательности легких и тяжелых цепей, как представлено в таблице ниже.

[00115] Таблица 1: ПОЛНОРАЗМЕРНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ LC И HC ГУМАНИЗИРОВАННЫХ АНТИТЕЛ К ANGPT2.

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
ANGPT2-opt-1 (гуманизированная) тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVRQ APGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAREAFDYEGDYGMAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	31

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
ANGPT2-opt-2 (гуманизированная) тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIEYFINWVRQ APGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDТАVYYCAREAFDYEGDYYGMAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	33
ANGPT2-opt-13 (гуманизированная) тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVRQ APGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDТАVYYCAREAFDYDGDYYGMAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	35
ANGPT2-opt-19 (гуманизированная) тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVRQ APGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDТАVYYCAREAFDYDGDYYGMAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	37
ANGPT2-opt-31 (гуманизированная) тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFIDYFINWVRQ APGQGLEWMGKIGPGSGSSSSNEKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDТАVYYCAREAFDYDGDYYGMAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	39
ANGPT2-opt-1 (гуманизированная) легкая цепь	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKSSQSLLASGNQKNFLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRESGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQNDHSYPITFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	32

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
ANGPT2-opt-2 (гуманизированная) легкая цепь	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>KSSQSLLASGNQKNFLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASTRES</u> GIPARFSGSGSGTEFTLT SSLQSEDFAVYYC <u>QNDHSYPITFGQGTKLEIKRTVAAPSV</u> FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	34
ANGPT2-opt-13 (гуманизированная) легкая цепь	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>KSSQSLLSSGNQKSFLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASTRET</u> GIPARFSGSGSGTEFTLT SSLQSEDFAVYYC <u>QNDHSYPITFGQGTKLEIKRTVAAPSV</u> FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
ANGPT2-opt-19 (гуманизированная) легкая цепь	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVLSSGNQKSFLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASTRET</u> GIPARFSGSGSGTEFTLT SSLQSEDFAVYYC <u>QNDHSYPITFGQGTKLEIKRTVAAPSV</u> FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	38
ANGPT2-opt-31 (гуманизированная) легкая цепь	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>KSSQSLLSSGNQKSFLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASTRES</u> GIPARFSGSGSGTEFTLT SSLQSEDFAVYYC <u>QNDHSYPITFGQGTKLEIKRTVAAPSV</u> FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	40

[00116] Таблица 2: CDR гуманизированных антител К ANGPT2 согласно системам нумерации CHEMICAL COMPUTING ГРУППА (CCG), Кэбота и Чотиа.

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
Н-CDR1 из CL-209881 ANGPT2-opt-1 ANGPT2-opt-13 ANGPT2-opt-19 ANGPT2-opt-31	<u>GYIFIDYFIN</u>	13
Н-CDR1 из ANGPT2-opt-2	<u>GYIFIEYFIN</u>	14
Н-CDR2 из CL-209881 ANGPT2-opt-1 ANGPT2-opt-2 ANGPT2-opt-13 ANGPT2-opt-19 ANGPT2-opt-31	<u>KIGPGSGSSSSNEKFKG</u>	15
Н-CDR3 из CL-209881 ANGPT2-opt-13 ANGPT2-opt-19 ANGPT2-opt-31	<u>EAFDYDGDYYGMAY</u>	16
Н-CDR3 из ANGPT2-opt-1 ANGPT2-opt-2	<u>EAFDYEYDYYGMAY</u>	17
Л-CDR1 из CL-209881	<u>KSSQSLLNSGNQKNFLA</u>	18
Л-CDR1 из ANGPT2-opt-1 ANGPT2-opt-2	<u>KSSQSLLASGNQKNFLA</u>	19

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
L-CDR1 из ANGPT2-opt-13 ANGPT2-opt-31	<u>KSSQSLSSGNQKSFLA</u>	20
L-CDR1 из ANGPT2-opt-19	<u>RASQSVLSSGNQKSFLA</u>	21
L-CDR2 из CL-209881 ANGPT2-opt-1 ANGPT2-opt-2 ANGPT2-opt-31	<u>GASTRES</u>	22
L-CDR2 из ANGPT2-opt-13 ANGPT2-opt-19	<u>GASTRET</u>	23
L-CDR3 из CL-209881 ANGPT2-opt-1 ANGPT2-opt-2 ANGPT2-opt-13 ANGPT2-opt-31	<u>QNDHSPIT</u>	24
L-CDR3 из BI00767086	<u>QQDHSYPIT</u>	25
H-CDR1 для SEQ ID NO. 15 (Кэбот)	DYFIN	26
H-CDR1 для SEQ ID NO. 16 (Кэбот)	EYFIN	27
H-CDR1 для SEQ ID NO. 15 (Чотиа)	<i>GYIFIDY</i>	28
H-CDR1 для SEQ ID NO. 16 (Чотиа)	<i>GYIFIEY</i>	29
H-CDR2 для SEQ ID NO. 17 (Чотиа)	<i>GPGSGS</i>	30

[00117] Представленные выше CDR согласно нумерации Chemical Computing Группа (CCG) подчеркнуты (Almagro и др., Proteins 2011; 79:3050-3066 и Maier и др., Proteins 2014; 82:1599-1610). Последовательности, определенные согласно номенклатуре Кэбота, выделенные жирным шрифтом, а определенные согласно системе нумерации Чотиа, выделены курсивом.

[00118] Гуманизация и варианты аминокислотных последовательностей

[00119] Дальнейшие варианты ANGPT2 антител и фрагментов антител могут быть сконструированы на основе набора CDR, представленного на SEQ ID NO: 13 - 25. Предполагается, что в вариантах аминокислотных последовательностей антител к ANGPT2 и фрагментов антител CDR остаются неизменными, но окружающие области, например, FR области, могут быть сконструированы. Варианты аминокислотной последовательности антитела к ANGPT2 можно получать путем интродукции соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела к ANGPT2 или с помощью пептидного синтеза.

Указанные варианты включают, например, делеции и/или инсерции и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антител к ANGPT2, представленных в качестве примера в настоящем описании. Для получения конечной конструкции применяют любую комбинацию делеций, инсерций и
5 замен при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Аминокислотные изменения могут также изменять пост-трансляционный процессинг гуманизированного антитела к ANGPT2 или его варианта, например, изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

10 **[00120]** В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение включает ANGPT2-антитела или их фрагменты антител, имеющие переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, где аминокислотная последовательность переменной тяжелой цепи и аминокислотная последовательность переменной легкой цепи являются по меньшей мере на
15 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO. 3 или 8; или 4 или 9; или 5 или 10; или 6 или 11; или 7 или 12, соответственно.

[00121] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение
20 включает антитела к ANGPT2 или их фрагменты антител, имеющие тяжелую цепь и легкую цепь, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи и аминокислотная последовательность легкой цепи являются по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичны аминокислотным
25 последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 31 или 32; или 33 или 34; или 35 или 36; или 37 или 38; или 39 или 40, соответственно.

[00122] Другим типом получения аминокислотного варианта антитела является изменение исходной схемы гликозилирования антитела. Термин «изменение» в контексте настоящей заявки означает делецию одного или
30 нескольких углеводных фрагментов, присутствующих в антителе, и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, ранее не присутствующих в антителе.

[00123] В некоторых аспектах, настоящее изобретение включает молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты аминокислотных

последовательностей антител к ANGPT2, описанных в настоящей заявке. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей антитела к ANGPT2, готовят с помощью различных методов, известных в данной области техники. Эти методы
5 включают, но не ограничиваясь только ими, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотных последовательностей) или получение с помощью мутагенеза с использованием олигонуклеотидов (или сайтнаправленного мутагенеза), ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза полученного ранее варианта или не являющейся
10 вариантом версии антитела к ANGPT2.

[00124] В определенных вариантах осуществления, антитело к ANGPT2 представляет собой фрагмент антитела. Существуют техники, которые были разработаны для получения фрагментов антител. Фрагменты можно получать путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например,
15 Morimoto и др., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24, 1992, сс. 107-117 и Brennan и др., Science 229, 1985, с. 81). В альтернативном варианте фрагменты можно получать непосредственно в рекомбинантных клетках-хозяевах. Например, Fab'-SH-фрагменты можно выделять непосредственно из *E. coli* и химически сшивать с получением F(ab')₂-фрагментов (см., например,
20 Carter и др., Bio/Technology 10, 1992, сс. 163-167). Согласно другому подходу F(ab')₂-фрагменты можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантной клетки-хозяина. Другие методики получения фрагментов антител должны быть очевидны специалисту в данной области.

[00125] Антитела к ANGPT2 и их антигенсвязывающие фрагменты могут
25 включать модификации.

[00126] В определенных вариантах осуществления, может являться желательным применять фрагмент антитела к ANGPT2, а не интактное антитело. Может являться желательным модифицировать фрагмент антитела для
30 повышения его времени полужизни в сыворотке крови. Это можно осуществлять, например, путем инкорпорирования эпитопа связывания рецептора реутилизации в фрагмент антитела. В одном способе, подходящий участок фрагмента антитела может быть изменен (например, мутирован), или эпитоп может быть инкорпорирован в пептидную метку, которую затем сливают с

фрагментом антитела на любом конце или в середине, например, путем синтеза ДНК или пептидного синтеза. См., например, WO 96/32478.

5 [00127] В других вариантах осуществления, настоящее изобретение включает ковалентные модификации антител к ANGPT2. Ковалентные модификации включают модификацию цистеинильных остатков, гистидильных остатков, лизинильных и аминоконцевых остатков, аргинильных остатков, тирозильных остатков, карбоксильных боковых групп (аспартил или глутамил), глутаминильных и аспарагинильных остатков, или серильных, или треонильных остатков. Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное сшивание гликозидов с антителом. Указанные модификации можно осуществлять с помощью химического синтеза или путем ферментативного или химического расщепления антитела, если это возможно. Для интродукции других типов ковалентных модификаций в молекулу антитела можно применять взаимодействие меченых аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим агентом, который может взаимодействовать с 15 выбранными боковыми цепями или аминоконцевыми или карбоксиконцевыми остатками.

[00128] Удаление любых углеводных фрагментов, присутствующих на антителе, можно осуществлять химическим или ферментативным путем. 20 Химическое дегликозилирование описано у Hakimuddin и др., Arch. Biochem. Biophys. 259, 1987, с. 52 и у Edge и др., Anal. Biochem., 118, 1981, с. 131. Ферментативное отщепление углеводных фрагментов на антителах можно осуществлять с помощью эндо- и экzogликозидаз согласно методу, описанному у Thotakura и др., Meth. Enzymol., 138, 1987, с. 350.

25 [00129] Другой тип пригодной ковалентной модификации предусматривает связывание антитела с одним из многочисленных небелковых полимеров, таких, например, как полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль или полиоксиалкилены, с помощью методов, описанных в одном или нескольких US 4640835, US 4496689, US 4301144, US 4670417, US 4791192 и US 4179337.

30 [00130] **Связывание эпитопа**

[00131] В другом аспекте, изобретение относится к антителу, которое распознает специфический «эпитоп ANGPT2 антигена» и «ANGPT2 эпитоп». В особенности, антитело в соответствии с изобретением связывается с эпитопом в

концевом фибриноген-подобном домене (FLD) домена ANGTP2 человека с последовательностью SEQ ID NO: 50.

[00132] В одном аспекте, изобретение относится к ANGTP2 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотной области 117-148 FLD домена ANGTP2 человека (который находится на С-конце полноразмерного белка ANGPT2 человека), как указано в SEQ ID NO: 50.

[00133] В другом аспекте, изобретение относится к ANGTP2 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывается с SEQ ID NO: 51.

[00134] Последовательности SEQ ID NO: 50 и 51 представлены в таблице ниже.

Таблица 3. FLD домен ANGPT2 человека и ANGPT2 эпитоп антител согласно изобретению.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
FLD домен ANGTP2 человека	KEEQISFRDC AEVFKSGHTT NGIYTLTFPN STEEIKAYCD MEAGGGGWTTI IQRREDGSVD FQRTWKEYKV GFGNPSGEYW LGNEFVSQLT NQQRYVLKIH LKDWEGNEAY SLYEHFYLSS EELNYRIHLK GLTGTA GKIS TKDGDNDKCI CKCSQMLTGG WWFDACGPSN LNGMYYPQRQ NTNKFNGIKW YYWKGSYGSL KATMMIRPA DF	SEQ ID NO: 50
ANGTP2 эпитоп	YLSSEELNYR IHLKGLTGTA G	SEQ ID NO: 51

[00135] Как используется в настоящей заявке, термины «эпитоп ANGPT2 антигена» и «ANGPT2 эпитоп» относится к молекуле (например, пептиду) или фрагменту молекулы, способной (му) связываться с антителом к ANGPT2 или его антигенсвязывающим фрагментом. Эти термины дополнительно включают, например, ANGPT2 антигенную детерминанту, которая распознается любыми из антител или фрагментов антител согласно настоящему изобретению, которая имеет комбинацию CDR легкой и тяжелой цепи, выбранной из CDR легкой цепи, представленных в SEQ ID NO. 18 – 25, и CDR тяжелой цепи, представленных в SEQ ID NO. 13 - 17. В дальнейшем варианте осуществления, ANGPT2 антигенная детерминанта, которая распознается любыми из антител или фрагментов антител согласно настоящему изобретению, имеет комбинацию CDR легкой и тяжелой цепи, выбранную из CDR легкой цепи, представленных в SEQ ID NO. 19 - 25, и CDR тяжелой цепи, представленных в SEQ ID NO. 13 - 17.

[00136] Эпитопы ANGPT2 антигена могут быть включены в белки, фрагменты белков, пептиды или подобные. Эпитопы наиболее часто представляют собой белки, короткие олигопептиды, олигопептидные имитаторы (то есть, органические соединения, которые имитируют антителосвязывающие свойства ANGPT2 антигена), или их комбинации.

[00137] Было обнаружено, что антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению связываются с уникальным эпитопом в FLD домене ANGPT2 человека. Предпочтительно, антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотной области FLD домена ANGPT2 человека с последовательностью SEQ ID NO: 50.

[00138] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей FLD домена ANGPT2 человека с последовательностью SEQ ID NO: 51.

[00139] Таким образом, в контексте связывания эпитопа, выражение «связывается в пределах аминокислотной области X-Y...» обозначает, что антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотной области, указанной в последовательности.

[00140] Если, например, антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотной области 117 - 148, это обозначает, что антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком либо в пределах аминокислотной области 117 - 148 FLD домена ANPT2 человека с последовательностью SEQ ID NO: 50.

[00141] В другом аспекте, антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 117-148 FLD домена ANGPT2 человека с последовательностью SEQ ID NO: 50.

[00142] На Фигуре 2 представлены результаты картирования эпитопов для химерной лидерной CL_209881, ANGPT2-opt-13 (иллюстративного антитела к

ANGPT2 согласно изобретению), аналога nesvacumab (где остаток лизина в положении 219 заменен на аргинин, K219R), MEDI3617 аналога, и LC06. Сайты специфического связывания для каждой молекулы к внеклеточному FLD домену ANGPT2 человека выделены темно-серым. Химерная лидерная CL_209881 и ANGPT2-opt-13 (которое имеет происхождение из CL_209881) связываются с эпитопом, который отличается от эпитопов, с которыми связываются антитела сравнения.

[00143] Антитела к ANGPT2 согласно изобретению блокируют физическое взаимодействие между ANGPT2 и Tie2 экспрессирующими клетками, и демонтируют полное ингибирование Tie2 фосфорилирования, опосредуемое полноразмерным ANGPT2 олигомером.

[00144] Антитела к ANGPT2 согласно изобретению являются высоко селективными. Отсутствует связывание с FLD доменом ANGPT1 человека, которое можно обнаружить при наивысшей тестируемой концентрации (500 нМ). Кроме того, антитела к ANGPT2 согласно изобретению не проявляют неспецифического связывания с заряженными или гидрофобными поверхностями, при тестировании вплоть до 1 мкМ.

[00145] Данные аффинности связывания показывают, что антитела к ANGPT2 согласно изобретению имеют высокую аффинность и являются высоко селективными для блокирования ANGPT2. Например, антитела к ANGPT2 согласно изобретению имеют высокую связывающую аффинность к FLD доменам ANGPT2 человека, яванской макаки и кролика.

[00146] Так как антитела к ANGPT2 согласно изобретению не проявляют связывающей аффинности к рекомбинантным мышинным ANGPT2 белкам, то осуществляли исследования эффективности у мышей с мышинной перекрестно-реагирующей инструментальной молекулой (аналогом nesvacumab), которая распознает FLD домен мышинного ANGPT2 (K_D : ~200 пМ). В этих исследованиях, используя доклиническую модель заболевания и механистически релевантную (мыши db/db UNX), лечение с применением аналога nesvacumab в течение 8-10 недель, и на уровнях дозирования, подавляющих свободно циркулирующий ANGPT2, приводило к существенному увеличению клубочкового Tie2 фосфорилирования и уменьшению фенотипа заболевания, включая существенные улучшения структуры почек (снижение гломерулосклероза и интерстициального фиброза).

[00147] В то время как антитела к ANGPT2 согласно изобретению не могут тестироваться на мышах относительно уменьшения прогрессирования нефропатии, слабая связывающая аффинность антител к ANGPT2 согласно изобретению с FLD доменом ANGPT2 крысы предоставляет возможность тестирования молекулы на сильной механистической модели проницаемости в условиях *in vivo* у крыс, известной как исследование Miles. В исследовании Miles используют преимущества VEGF-опосредованного высвобождения ANGPT2 из гранул для хранения в эндотелиальных клетках, что приводит к быстрой дестабилизации сосудов в условиях *in vivo*, и эффекту, который может быть количественно определен; модель была валидирована с аналогом nesvacumab. В исследовании Miles у крыс, наблюдали антипроницаемый эффект ANGPT2-opt-13 (49% уменьшение проницаемости относительно IgG контроля), подтверждая активность в условиях *in vivo* относительно блокирования ANGPT2-опосредованной сосудистой дестабилизации.

[00148] Исследовали цитотоксичности антител к ANGPT2 согласно изобретению, используя исследование ANGPT2 комплементзависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (CDC). CDC исследование включает два ANGPT1/ANGPT2 перекрестно реагирующих антитела (MEDI3617 аналог и LC06), антитело сравнения, которое перекрестно не реагирует с ANGPT1 (аналог nesvacumab), и иллюстративное антитело к ANGPT2 согласно изобретению (ANGPT2-opt-13).

[00149] Результаты CDC исследования (Фигуры 1A и 1B), демонстрируют, что ANGPT1/ANGPT2 перекрестно реагирующие антитела сравнения (MEDI3617 аналог и LC06) и ANGPT2 специфическое антитело сравнения (аналог nesvacumab) все проявляют более высокие цитотоксичности по сравнению с ANGPT2-opt-13.

[00150] Терапевтические применения

[00151] В одном варианте осуществления, антитела к ANGPT2 согласно изобретению, или их антигенсвязывающие фрагменты пригодны для лечения или предотвращения заболеваний или нарушений, которые могут быть облегчены путем нейтрализации ANGPT2 («ANGPT2 связанные заболевания или нарушения»).

[00152] В другом варианте осуществления, антитела к ANGPT2 согласно изобретению, или их антигенсвязывающие фрагменты, пригодны в качестве лекарственного средства.

[00153] В одном варианте осуществления, ANGPT2 заболевание или
5 нарушение выбирают из группы, включающей нарушение, связанное с ANGPT2 также включает гипертрофию сердца, инфаркт миокарда, ишемию, ишемическое реперфузионное повреждение, удар гипертензию, легочную артериальную гипертензию, идиопатическую легочную артериальную гипертензию, нарушения
10 мозговой деятельности, индуцированные травмой, астму, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, гипертензию, вызванной беременностью и преэклампсией, сепсис, тяжёлый сепсис, септический шок, неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз, болезнь минимальных изменений, фокально-сегментарный гломерулосклероз (FSGS),
15 нефротический синдром, диабетическое заболевание почек (DKD), хроническую болезнь почек (CKD), диабетическую почечную недостаточность, терминальную стадию почечной недостаточности, ишемию или ишемическое реперфузионное повреждение, злокачественное новообразование, гепатоцеллюлярную карциному, идиопатический фиброз лёгких (IPF), эмфизему, острое повреждение
20 лёгких (ALI), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), тяжёлый острый респираторный синдром (SARS), ближневосточный респираторный синдром (MERS), повышенную проницаемость сосудов (и ассоциированные нарушения), острое повреждение почек, почечно-клеточную карциному, сердечную недостаточность, волчаночный нефрит, синдром Рейно, панкреатит,
25 заболевание периферических артерий, врождённое заболевание сердца, вирус Денге, малярию, хантавирус, отек, регенерацию, волчанку, интерстициальное заболевание легких, склеродерму, ретинопатии, диабетическую нефропатию, портальную гипертензию, рост варикозов и пересадку печени.

[00154] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение
30 относится к способу лечения NASH, цирроза, портальной гипертензии, роста варикозов кровотечения из варикозно расширенных вен, и гепатической энцефалопатии.

[00155] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения хронического заболевания почек. Термин

«хроническое заболевание почек» в целом относится к пациенту, имеющему уменьшенную функцию почек, что измеряется с помощью скорости клубочковой фильтрации (GFR) или. Расчетная GFR (eGFR) 90 или больше (Стадия 1) рассматривается как нормальная функция почек; eGFR или 89 - 60 (Стадия 2) рассматривается как умеренная потеря функции почек; eGFR от 59 до 45 (Стадия 3a) рассматривается как умеренная - средняя потеря функции почек; eGFR от 44 до 30 (Стадия 3b) рассматривается как средняя – тяжелая потеря функции почек; и GFR от 29 до 15 (Стадия 4) рассматривается как тяжелая потеря функции почек.

10 **[00156]** В другом варианте осуществления, СКД пациентов имеют соотношение альбумин/креатинин (UACR) ≥ 30 мг/г и eGFR 20 - 75 мл/мин/1,73 м² или 15 - 60 мл/мин/1,73 м².

[00157] В одном варианте осуществления, изобретение относится к лечению Стадии 2 хронического заболевания почек; в другом варианте осуществления, изобретение относится к лечению Стадии 3a хронического заболевания почек; в другом варианте осуществления, изобретение относится к лечению Стадии 3b хронического заболевания почек; и в другом варианте осуществления, изобретение относится к лечению Стадии 4 хронического заболевания почек.

20 **[00158]** В другом варианте осуществления, изобретение относится к лечению хронического заболевания почек у пациента, имеющего $\geq$ eGFR 60; в другом варианте осуществления, изобретение относится к лечению хронического заболевания почек у пациента, имеющего $\geq$ eGFR 45; в другом варианте осуществления, изобретение относится к лечению хронического заболевания почек у пациента, имеющего $\geq$ eGFR 30; и в другом варианте осуществления, изобретение относится к лечению хронического заболевания почек у пациента, имеющего $\geq$ eGFR 20.

[00159] В другом варианте осуществления, изобретение относится к лечению хронического заболевания почек у пациента, имеющего eGFR 20-75 мл/мин/1,73 м².

30 **[00160]** В другом варианте осуществления, изобретение относится к способу лечения хронического заболевания почек у пациента, имеющего UACR ≥ 30 мг/г.

[00161] В другом варианте осуществления, изобретение относится к способу лечения хронического заболевания почек у быстро прогрессирующих

(динамичная прогрессия) пациентов. Как используется в настоящей заявке, термин быстро прогрессирующие СКД пациенты имеют eGFR 20-75 мл/мин/1,73 м² и снижение ≥ 3 мл/мин/1,73 м²/год. В другом варианте осуществления, быстро прогрессирующие СКД пациенты имеют eGFR 20-75 мл/мин/1,73 м² и
5 снижение ≥ 4 мл/мин/1,73 м²/год.

[00162] В другом варианте осуществления, изобретение относится к способу уменьшения прогрессирования до терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD), диализа и/или осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы у СКД пациента, имеющего eGFR 20-75 мл/мин/1,73 м².

10 **[00163]** В другом варианте осуществления, изобретение относится к способу уменьшения риска осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы у СКД пациента, например, пациента, имеющего eGFR 20-75 мл/мин/1,73 м².

[00164] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение
15 относится к способу лечения диабетической нефропатии.

[00165] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения повышенной проницаемости сосудов и/или их ассоциированных нарушений. Они включают (I) нарушения со стороны дыхательной системы, связанные с повышенной проницаемостью сосудов,
20 которые первично не вызываются инфекцией (Группа 1), и (II) нарушения со стороны дыхательной системы, связанные с повышенной проницаемостью сосудов, вызываемые определенными бактериальными, вирусными или грибковыми паразитарными инфекциями (Группа 2).

[00166] Неограничивающие нарушения со стороны дыхательной системы,
25 связанные с повышенной проницаемостью сосудов Группы 1, включают пульмональный (легочный) отек, идиопатическую интерстициальную пневмонию, IPF и выраженное обострение IPF, ARDS, не связанный с инфекцией, и ALI; и

[00167] Неограничивающие нарушения со стороны дыхательной системы,
30 связанные с повышенной проницаемостью сосудов Группы 2, включают ARDS, связанный и инфекцией, SARS, MERS, сепсис, тяжёлый сепсис, и септический шок.

[00168] ARDS, не связанный с инфекцией, понимают как ARDS, который не запускается или не вызывается инфекцией, такой как ARDS, вызываемый

вдыханием вредных веществ (например, токсического дыма), травмой, панкреатитом, рефлюксом желудочного сока, массивными переливаниями крови или ожогами.

5 [00169] ARDS, связанный с инфекцией, понимается как ARDS, который запускается или вызывается инфекцией, такой как ARDS, вызываемый сепсисом или тяжелой пневмонией.

[00170] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к лечению повышенной проницаемости сосудов.

10 [00171] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к лечению повышенной проницаемости сосудов, развивающейся вследствие или вызываемой бактериальной инфекцией, включая, но не ограничиваясь только ими, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae*, *Sterptococcus pneumonia*, *Klebsiella*, *Mycoplasma pneumonia*, и *Staphylococcus aureus*.

15 [00172] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к лечению повышенной проницаемости сосудов, развивающейся вследствие или вызываемой грибковой инфекцией, включая, но не ограничиваясь только ими, грибковую пневмонию и паразитарную пневмонию.

20 [00173] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к лечению повышенной проницаемости сосудов, развивающейся вследствие или вызываемой вирусной инфекций, включая, но не ограничиваясь только ими, вирус гриппа H1N1, респираторный синцитиальный вирус, вирус парагриппа, аденовирус и инфекции, вызванные коронавирусом человека (CoV), таким как SARS-CoV, SARS-CoV-2 и MERS-CoV.

25 [00174] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к лечению повышенной проницаемости сосудов, связанной с ALI, ARDS, или SARS.

Нетерапевтические применения

30 [00175] Антитела, представленные в настоящем описании, можно применять в качестве средств, используемых для очистки на основе аффинности. При осуществлении этого процесса антитела иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола, содержащая белок А, с помощью методов, хорошо известных в данной области. Иммобилизованное антитело приводят в контакт с образцом, содержащим ANGPT2 белок (или его фрагмент), который подлежит очистке, и

затем подложку отмывают приемлемым растворителем, который должен удалять практически весь материал в образце, кроме ANGPT2 белка, связанного с иммобилизованным антителом. И, наконец, подложку отмывают другим приемлемым растворителем, который должен отделять ANGPT2 белок от антитела.

[00176] Антитела к ANGPT2 также пригодны в диагностических исследованиях для обнаружения и/или количественного определения ANGPT2 белка, например, обнаружения экспрессии ANGPT2 в специфических клетках, тканях или сыворотке.

[00177] Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения целесообразно, например, для диагностических целей, метить антитело с помощью выявляемого фрагмента. Известны и доступны многочисленные выявляемые метки, такие как радиоизотопы, флуоресцентные метки, метки, представляющие собой субстраты для ферментов и т.п. Метку можно опосредованно конъюгировать с антителом с помощью различных известных методик. Например, антитело можно конъюгировать с биотином, и любую из указанных выше меток, относящихся к трем широким категориям, можно конъюгировать с авидином, или наоборот. Биотин избирательно связывается с авидином и поэтому метку можно конъюгировать с антителом опосредованным образом. В альтернативном варианте для достижения опосредованной конъюгации метки с антителом антитело можно конъюгировать с небольшим гаптенем (таким как дигоксин) и одну из различных типов указанных выше меток конъюгировать с антителом к гаптenu (например, антителом к дигоксину). Таким образом можно осуществлять опосредованную конъюгацию метки с антителом.

[00178] Примерами радиоизотопных меток являются ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I . Антитело можно метить радиоизотопом с помощью методик, описанных, например, в Current Protocols in Immunology, т. 1 и 2, 1991, под ред. Coligen и др., изд-во Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1991. Радиоактивность можно измерять, например, с помощью сцинтилляционного счетчика.

[00179] Примерами флуоресцентных меток являются известные метки, полученные на основе хелатов редкоземельных металлов (хелаты европия), или метки на основе флуоресцеина и его производных, родамина и его производных, дансила, лиссамина, фикоэритрина и тexasского красного. Флуоресцентные

метки можно конъюгировать с антителом с помощью известных методик, например, описанных в Current Protocols in Immunology. Флуоресценцию можно оценивать количественно с помощью флуориметра.

[00180] В данной области известны различные хорошо охарактеризованные фермент-субстратные метки (см., например, обзор, приведенный в US 4275149). Фермент, как правило, катализирует химическое изменение хромогенного субстрата, которое можно оценивать с помощью различных методик. Например, изменение может представлять собой изменение цвета субстрата, которое можно оценивать спектрофотометрически. В другом варианте фермент может изменять флуоресценцию или хемилюминесценцию субстрата. Методики количественной оценки флуоресценции описаны выше. В результате химической реакции в хемилюминесцентном субстрате возникает электронно-возбуждённое состояние, вследствие чего он может испускать свет, который можно оценивать, например, с помощью хемилюминометра, или он является донором энергии для флуоресцентного акцептора.

[00181] Примерами ферментативных меток являются люциферазы, такие как люцифераза светляка и бактериальная люцифераза (US 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, малатдегидрогеназа, уреаза, пероксидаза, например, пероксидаза из хрена (HRPO), щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, оксидазы сахаридов (такие как оксидаза глюкозы, оксидаза галактозы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), оксидазы гетероциклических соединений (такие как уриказа и оксидаза ксантина), лактопероксидаза, микропероксидаза и т.п. Методики конъюгации ферментов с антителами описаны, например, у O'Sullivan и др., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, в: Methods in Enzym., под ред. J. Langone и H. Van Vunakis, изд-во Academic press, N.Y., 73, 1981, сс. 147-166.

[00182] Примерами комбинаций фермент-субстрат являются, например: пероксидаза из хрена (HRPO) и гидрогенпероксидаза в качестве субстрата, при этом гидрогенпероксидаза окисляет краситель-предшественник, такой как ортофенилендиамин (OPD) или гидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB); щелочная фосфатаза (AP) и *para*-нитрофенилфосфонат в качестве хромогенного субстрата; и β -D-галактозидаза (β -D-Gal) и хромогенный субстрат,

такой, например, как *пара*-нитрофенил- β -D-галактозидаза, или флуорегенный субстрат, такой как 4-метилумбеллиферил- β -D-галактозидаза.

[00183] Специалистам в данной области известны многочисленные другие комбинации фермент-субстрат. Общий обзор представлен, например, в US 4275149 и US 4318980.

[00184] В другом варианте осуществления изобретения антитело к ANGPT2 применяют в немеченом виде и выявляют с помощью меченого антитела, которое связывает антитело к ANGPT2.

[00185] Антитела, представленные в настоящем описании, можно применять в любом известном методе анализа, таком как конкурентные анализы связывания, прямые и косвенные сэндвич-анализы и анализы на основе иммунопреципитации (см., например, Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, изд-во CRC Press, Inc., 1987, сс. 147-158). Диагностические наборы.

[00186] Гуманизированное антитело к ANGPT2 можно применять в диагностическом наборе, представляющем собой упаковку, которая содержит комбинацию реагентов, взятых в предварительно определенных количествах, в сочетании с инструкциями по осуществлению диагностического анализа. Если антитело мечено ферментом, то набор может включать необходимые для фермента субстраты и кофакторы, такие как субстрат-предшественник, образующий выявляемый хромофор или флуорофор. Кроме того, можно включать другие добавки, такие как стабилизаторы и буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и т.п. Относительные количества различных реагентов могут варьироваться в широких пределах, обеспечивая концентрации реагентов в растворе, которые в значительной степени оптимизируют чувствительность анализа. Реагенты могут представлять собой сухие порошки, как правило, лиофилизированные, включая эксципиенты, которые при растворении должны образовывать раствор реагента, имеющий соответствующую концентрацию.

[00187] Диагностические наборы

[00188] Антитело к ANGPT2 можно применять в диагностическом наборе, представляющем собой упаковку, которая содержит комбинацию реагентов, взятых в предварительно определенных количествах, в сочетании с инструкциями по осуществлению диагностического анализа. Если антитело мечено ферментом, то набор может включать необходимые для фермента

субстраты и кофакторы, такие как субстрат-предшественник, образующий выявляемый хромофор или флуорофор. Кроме того, можно включать другие добавки, такие как стабилизаторы и буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и т.п. Относительные количества различных реагентов могут варьироваться в широких пределах, обеспечивая концентрации реагентов в растворе, которые в значительной степени оптимизируют чувствительность анализа. Реагенты могут представлять собой сухие порошки, как правило, лиофилизированные, включая эксципиенты, которые при растворении должны образовывать раствор реагента, имеющий соответствующую концентрацию.

10 **[00189] Композиции и их введение**

[00190] Композиция, содержащая антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент, может вводиться субъекту, который страдает от или имеет риск развития ANGPT2 связанных заболеваний или нарушений, описанных в настоящей заявке. Изобретение дополнительно обеспечивает применение антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента для приготовления лекарственного средства для предотвращения или лечения ANGPT2 заболевания. Термин «субъект», как используется в настоящей заявке, обозначает любого пациента-млекопитающего, которому может вводиться антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент, включая, например, людей и определенных млекопитающих, отличающихся от человека, таких как приматы и собаки. Субъекты, специфически предназначены для лечения с применением способов, раскрытых в настоящей заявке, включают людей. Антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить либо отдельно или в комбинации с другими композициями.

25 **[00191]** Предпочтительные антитела для применения в таких фармацевтических композициях представляют собой те антитела, которые включают антитело в соответствии с изобретением.

[00192] Известны различные системы доставки и они могут использоваться для введения антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента. Способ введения включают, но не ограничиваясь только ими, интравитреальный, глазные капли, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, внутриносовой, эпидуральный и пероральный пути. Антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент могут вводиться, например, путем инфузии, болюса или инъекции, и могут вводиться совместно с

другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. В предпочтительных вариантах осуществления, введение осуществляют путем интравитреальной инъекции. Препараты для таких инъекций могут быть приготовлены, например, в предварительно заполненных шприцах.

[00193] Антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент можно водить в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента и один или несколько фармацевтически совместимых ингредиентов.

[00194] Согласно типичным вариантам осуществления изобретения фармацевтическую композицию приготавливают согласно общепринятым процедурам с получением фармацевтической композиции, пригодной для внутривенного или подкожного введения человеку. Как правило, композиции для введения путем инъекции представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости фармацевтическое средство может содержать также солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для снятия боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо их смешивают с получением стандартной дозы лекарственного средства, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или не содержащего воду концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества действующего вещества. В тех случаях, когда фармацевтическое средство предназначено для введения путем инфузии, то его можно разливать по бутылкам для инфузий, содержащим стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. В тех случаях, когда фармацевтическое средство вводят с помощью инъекции, то можно использовать ампулу со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором для того, чтобы ингредиенты можно было перемешивать перед введением.

[00195] Кроме того, фармацевтическую композицию можно включать в фармацевтический набор, который содержит (а) контейнер, содержащий антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент в лиофилизованной форме и (б) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или

разведения лиофилизованного антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента. Необязательно к указанному(ым) контейнеру(ам) может прилагаться уведомление в форме, утвержденной официальным агентством, разрешающим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, где в уведомлении отражено разрешение агентства на производство, применение или продажу с целью введения людям.

[00196] Количество антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента, которое эффективно для лечения или предотвращения заболеваний или нарушений, связанных с ANGPT2, можно определять обычными методами клинических исследований. Кроме того, необязательно можно использовать анализы *in vitro*, результаты которых могут способствовать определению оптимальных пределов доз. Точная доза для применения в препаративной форме также должна зависеть от пути введения и стадии нарушения, и она должна приниматься на основе рекомендаций лечащего врача и обстоятельств, характерных для каждого пациента. Эффективные дозы можно определять путем экстраполяции на основе кривых дозовой зависимости, полученных по результатам опытов *in vitro* или на модельных тест-системах с использованием животных.

[00197] Например, токсичность и терапевтическую эффективность антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента можно определить в клеточных культурах или на экспериментальных животных стандартными фармацевтическими методами, используемыми для определения ED₅₀ (терапевтически эффективная доза для 50% популяции). Предпочтительным является антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) проявляет высокий терапевтический индекс.

[00198] Данные, полученные по результатам анализов на клеточных культурах и исследований на животных, можно использовать при определении предела доз, предназначенных для применения на человеке. Как правило, доза антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента находится в пределах концентраций в кровотоке, которые включают ED₅₀, обладая при этом низкой токсичностью или не проявляя токсичности. Дозу можно варьировать в указанных пределах в зависимости от используемой лекарственной формы и применяемого пути введения. Для любого антитела к ANGPT2 или его

антигенсвязывающего фрагмента, используемого согласно способу, терапевтически эффективную дозу можно первоначально устанавливать по результатам анализов на клеточных культурах. Дозу можно определить, исходя из данных, полученных на животных моделях, достигая пределов концентраций в плазме крови, которые включают IC_{50} (т.е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается ингибирование симптомов, составляющее половину от максимального) по данным, полученным на культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения пригодных доз для человека. Можно определять концентрации в плазме крови, например, с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения, ELISA и т.п.

[00199] Для интравитреальной инъекции антитела к ANGPT2, как правило, предпочтительными являются более длительные интервалы между лечениями. Благодаря их улучшенной эффективности, антитела к ANGPT2 согласно настоящему изобретению могут вводиться с более длительными интервалами.

[00200] В одном варианте осуществления, ANGPT2-антитело вводят каждые 6 недель, или каждые 7 недель, или каждые 8 недель, или каждые 9 недель, или каждые 10 недель, или каждые 11 недель, или каждые 12 недель. В дальнейшем варианте осуществления, ANGPT2-антитело согласно изобретению вводят один раз каждые 3 месяца.

[00201] Антитела согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде препаратов в дозах, которые включают, но не ограничиваясь только ими от 20 мг/мл до 180 мг/мл; или 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл, или 100 мг/мл. Предпочтительно, антитела согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены в жидком препарате от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл.

[00202] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, содержащие антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент могут дополнительно включать терапевтическое средство, конъюгированное или неконъюгированное со связывающим агентом.

[00203] Такая комбинированная терапия может обладать аддитивным или синергетическим действием в отношении признаков заболевания (например, тяжести проявления симптома, количества симптомов или частоты рецидивов).

[00204] При применении схем лечения при комбинированном введении в конкретном варианте осуществления изобретения, антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят одновременно с терапевтическим средством. В другом конкретном варианте осуществления изобретения, терапевтическое средство вводят до или после введения антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента, в течение от 1 часа до нескольких месяцев, например, по меньшей мере, в течение 1 часа, 5 часов, 12 часов, суток, недели, месяца или трех месяцев до или после введения антитела к ANGPT2 или его антигенсвязывающего фрагмента.

[00205] Соединения согласно изобретению могут использоваться отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических средств могут включать:

[00206] противодиабетические лекарственные средства, такие как ингибиторы альфа-глюкозидазы (например, миглитол и акарбоза), аналоги амилина (например, прамлинтид), ингибиторы дипептидилпептидазы 4 (например, алоглиптин, ситаглиптин, саксаглиптин и линаглиптин), инкретиномиметики (например, лираглутид, эксенатид, лираглутид, эксенатид, дулаглутид, албиглутид и ликсисенатид), инсулин, меглитиниды (например, репаглинид и натеглинид), бигуаниды (например, метформин); ингибиторы SGLT-2 (например, канаглифлозин, эмпаглифлозин и дапаглифлозин), сульфонилмочевины (например, хлорпропамид, глимепирид, глибурид, глипизид, глибурид, толазамид и толбутамид), и тиазолидиндионы (например, росиглитазон и пиоглитазон);

[00207] антагонисты рецепторов ангиотензина II (блокаторы рецепторов ангиотензина (ARB)), такие как кандесартан, эпросартан, кандесартан, ирбесартан, лосартан, олмесартан, телмисартан, валсартан, азилсартан и медоксомил;

[00208] ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (например, беназеприл, каптоприл, эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, моэксиприл и периндоприл);

[00209] антикоагулянты (например, дабигатран, актилизе, варфарин, гепарин и ацетилсалициловая кислота);

[00210] бронхорасширяющие средства, включая бета-агонисты короткого действия и продолжительного действия (например, альбутерол, левальбутерол, сальметерол, формотерол, арформотерол, вилантерол, индакатерол и олодатерол) антихолинергические средства короткого действия и

5 продолжительного действия (ипратропий, тиотропий, умеклидиний, гликопирролатей и аклидиний);

[00211] стероиды, такие как флутиказон и будесонид;

[00212] противомаларийные средства, такие как гидроксихлорохин или хлорохин;

10 **[00213]** вирусостатические нуклеозидные аналоги, такие как ремдесивир; и

[00214] ингибиторы ВИЧ-протеазы, такие как лопинавир-ритонавир;

[00215] **Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные методы**

[00216] Настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, которые включают последовательность, кодирующую антитело к ANGPT2, векторы и клетки-хозяева, содержащие полинуклеотиды, и рекомбинантные методики для получения антитела. Выделенные полинуклеотиды могут кодировать любую желательную форму антитела к ANGPT2, включая, например, полноразмерные моноклональные антитела, Fab, Fab', F(ab')₂, и Fv фрагменты,

15

20 диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[00217] Полинуклеотид (ы), который (е) содержит (ат) последовательность, кодирующую антитело к ANGPT2 или его фрагмент или цепь, может (ут) быть сопряжен (ы) с одной или несколькими регуляторными или контролирующими

25 последовательностями, как известно в данной области техники, и могут содержаться в подходящих экспрессионных векторах или клетках-хозяевах, как известно в данной области техники. Каждая из полинуклеотидных молекул, кодирующих переменные домены тяжелой или легкой цепи, может быть независимо сопряжена с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей

30 константный домен, такой как константный домен человека, предоставляющий возможность продуцировать интактные антитела. Альтернативно, полинуклеотиды, или их части, могут быть сопряжены совместно, обеспечивая матрицу для получения одноцепочечного антитела.

[00218] Для рекомбинантного получения, полинуклеотид, кодирующий антитело, вставлен в реплицируемый вектор для клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. Доступны различные подходящие векторы для экспрессии рекомбинантных антител. Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваясь только ими, один или несколько следующих компонентов: сигнальная последовательность, начало репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор, и последовательность терминации транскрипции.

[00219] Антитела к ANGPT2 также могут быть получены в виде слитых полипептидов, в которых антитело слито с гетерологичным полипептидом, таким как сигнальная последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на аминоконце зрелого белка или полипептида. Гетерологическую сигнальную последовательность типично выбирают из последовательности, которая распознается и процессируется (то есть, расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальную последовательность антитела к ANGPT2, сигнальная последовательность может быть заменена прокариотической сигнальной последовательностью. Сигнальная последовательность может представлять собой, например, щелочную фосфатазу, пенициллиназу, липопротейн, лидерные последовательности термостабильного энтеротоксина II и подобные. Для секретиции дрожжами, нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, лидерной последовательностью, полученной из инвертазы альфа-фактора дрожжей (включая лидерные последовательности α -факторов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*), кислой фосфатазой, глюкоамилазой *C. albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в WO90/13646. В клетках млекопитающих, можно использовать сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, gD сигнальную последовательность простого герпеса. ДНК для такого участка-прекурсора лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей гуманизированное антитело к ANGPT2.

[00220] Экспрессионные и клонирующие векторы содержат нуклеотидную последовательность, которая предоставляет возможность вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. В целом,

в клонирующих векторах эта последовательность представляет собой последовательность, которая предоставляет возможность вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Начало репликации из плазмиды pBR322 является подходящим для большинства грамм-отрицательных бактерий, начало репликации 2-□□ Плазмиды являются подходящими для дрожжей, и различные вирусные начала репликации (SV40, полиома, аденовирус, VSV и BPV) пригодны для клонирующих векторов в клетках млекопитающих. В целом, компонент начала репликации не является необходимым для экспрессионных векторов млекопитающих (начало репликации SV40 типично можно использовать только потому, что он содержит ранний промотор).

[00221] Экспрессионные и клонирующие векторы могут содержать ген, который кодирует селектируемый маркер для облегчения идентификации экспрессии. Типичные селектируемые маркерные гены кодируют белки, которые придают резистентность к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, или альтернативно, являются комплементами аксотрофных дефицитов, или в других альтернативных вариантах, восполняют специфические питательные вещества, которые не присутствуют в комплексных питательных средах, например, ген, кодирующий D-аланин рацемат для *Bacilli*.

[00222] В одном из примеров схемы селекции используется лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий резистентность к лекарственному средству, и, следовательно, выживают в схеме селекции. Примерами такой доминантной селекции является использование лекарственных средств неомицин, микофеноловая кислота и гигромицин. Общепринятыми селектируемыми маркерами для клеток млекопитающих являются те, которые предоставляют возможность идентификации клеток, компетентных за принятие нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированное антитело к ANGPT2, такие как DHFR (дигидрофолатредуктаза), тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II (такие как гены металлотионеина приматов), аденозиндеаминаза, орнитиндекарбоксилаза, и

другие. Клетки, трансформируемые с помощью DHFR-селектируемого гена, сначала идентифицируют путём культивирования всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Применяемая подходящая клетка-хозяин, если используют DHFR дикого типа, представляет собой клеточную линию яичников китайского хомячка (CHO) с дефицитом активности DHFR (например, DG44).

[00223] Альтернативно, клетки-хозяева (предпочтительно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или контрансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитело к ANGPT2, белок DHFR дикого типа, и другой селектируемый маркер, такой как аминогликозид 3'-фосфотрансфераза (APH), могут быть селектированы путем роста клеток в среде, содержащей селектируемый агент для селектируемого маркера, такой как аминогликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин, или G418. см., например, патент US 4,965,199.

[00224] Когда рекомбинантное получение осуществляют в дрожжевой клетке в качестве клетки-хозяина, то в качестве селектируемого маркера можно использовать ген TRP1, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb и др., 1979, Nature 282: 39). Ген TRP1 обеспечивает селекционный маркер для мутантного штамма дрожжей, у которого отсутствует способность расти в триптофане, например, № ATCC 44076 или PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). Впоследствии присутствие trp1 поражения в геноме дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективное окружение для обнаружения трансформации путем роста при отсутствии триптофана. Аналогичным образом, штаммы дрожжей с дефицитом Leu2p, такие как ATCC 20,622 и 38,626 дополняются известными плазмидами, несущими ген LEU2.

[00225] Дополнительно, векторы, имеющие происхождение из кольцевой плазмиды 1,6 мкм pKD1, можно использовать для трансформации дрожжей *Kluveromyces*. Альтернативно, была описана экспрессионная система для промышленного получения рекомбинантного телачьего химозина для *K. lactis* (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). Также были описаны стабильные многокопийные экспрессирующие векторы для секреции зрелого рекомбинантного сывороточного альбумина человека с помощью промышленных штаммов *Kluveromyces* (Fleer и др., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

[00226] Экспрессионные и клонирующие векторы обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к ANGPT2 или его полипептидную цепь. Промоторы, подходящие для применения с прокариотическими хозяевами, включают *rhoA* промотор, β -лактамазную и лактозную промоторные системы, щелочную фосфатазу, триптофановую (*trp*) промоторную систему, и гибридные промоторы, такие как *tac* промотор. Подходящими также являются другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для применения в бактериальных системах также будут содержать последовательность Шайна-Дальгамо (Shine-Dalgarno, S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей гуманизированное антитело к ANGPT2.

[00227] Известны многие эукариотические промоторные последовательности. В действительности, все эукариотические гены имеют АТ-обогащенный участок, расположенный на приблизительно 25 - 30 пар против хода транскрипции от сайта инициации транскрипции. Другая последовательность, в которой 70 - 80 оснований против хода транскрипции от старта транскрипции многих генов, представляет собой CNCAAT участок, где N может представлять собой любой нуклеотид. На 3' конце большинства эукариотических генов присутствует AATAAA последовательность, которая может являться сигналом для добавления поли-А хвоста к 3' концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности подходяще вставлены в экспрессионные векторы.

[00228] Примеры подходящих промоторных последовательностей для применения с дрожжами-хозяевами, включают промоторы для 3-фосфоглицерат киназы или других гидролитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа, гексокиназа, пируват декарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфат изомераза, 3-фосфоглицерат мутаза, пируват киназа, триозофосфат изомераза, фосфоглюкозоизомераза, и глюкокиназа.

[00229] Индуцибельные промоторы имеют дополнительные преимущества транскрипции под контролем условий роста. Они включают промоторные участки дрожжей для алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, производных ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, и ферментов,

отвечающих за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы для применения для экспрессии в дрожжах дополнительно описаны в ЕР 73,657. Дрожжевые энхансеры также благоприятно используются с дрожжевыми промоторами.

5 **[00230]** Транскрипция антитела к ANGPT2 из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как Аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40),
10 из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, актиновый промотор или иммуноглобулиновый промотор, или из промоторов теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

[00231] Ранние и поздние промоторы вируса SV40 легко получают в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит начало репликации
15 вируса SV40. Немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека легко получают в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК в млекопитающих-хозяевах, используя вирус папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора, описан в патенте US № 4,419,446. Модификация этой системы описана в патенте US № 4,601,978. См. также Reyes и др., 1982, Nature
20 297:598-601, где описана экспрессия кДНК п-интерферона человека в мышинных клетках под контролем тимидинкиназного промотора из вируса простого герпеса. Альтернативно, в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

[00232] Другим полезным элементом, который может использоваться в
25 рекомбинантном экспрессионном векторе, является энхансерная последовательность, которую используют для усиления транскрипции ДНК, кодирующей антитело к ANGPT2, высшими эукариотами. В настоящее время известны много энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (например, глобин, эластаза, альбумин, α -фетопротеин и инсулин). Тем не менее,
30 типично используют энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают SV40 энхансер на поздней стороне начала репликации (по 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на поздней стороне начала репликации и аденовирусные энхансеры. Также см. Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 относительно описания энхансерных элементов для активации

эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в положении 5' или 3' к антителу к ANGPT2-кодирующей последовательности, но предпочтительно он расположен на 5' сайте от промотора.

[00233] Экспрессионные векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжи, грибы, насекомые, растения, животные, люди или ядродержащих клетках из других многоклеточных организмов) также могут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности являются общедоступными из 5' и, иногда 3', нетранслируемых участков эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело к ANGPT2. Одним из пригодных компонентов терминации транскрипции является участок полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO94/11026 и экспрессионный вектор, описанный в этом документе. В некоторых вариантах осуществления, антитела к ANGPT2 могут быть экспрессированы, используя CHEF систему. (См., например, патент US № 5888809; содержание которого включено в настоящую заявку в качестве ссылки.)

[00234] Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессирования ДНК в векторах согласно настоящему изобретению представляют собой клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот, описанные выше. Подходящие прокариоты для этой цели включают эубактерии, такие как грамм-отрицательные или грамм-положительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, Serratia, например, Serratia marcescans, и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis (например, B. licheniformis 41 P, раскрытые в DD 266,710, опубликованном 12 апреля 1989 г.), Pseudomonas, такие как P. aeruginosa, и Streptomyces. Одним из предпочтительных хозяев для клонирования E. coli является E. coli 294 (ATCC 31,446), хотя пригодны также другие штаммы, такие как E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31,537), и E. coli W3110 (ATCC 27,325). Эти примеры являются иллюстративными, а не ограничительными.

[00235] Дополнительно к прокариотам, эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессирования векторов, кодирующих антитело к ANGPT2. *Saccharomyces cerevisiae*, или общераспространенные хлебопекарные дрожжи наиболее часто используются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Тем не менее, различные другие рода виды и штаммы является общедоступными и пригодными в настоящей заявке, такие как *Schizosaccharomyces pombe*; хозяева *Kluyveromyces*, такие как, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и нитчатые грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

[00236] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела к ANGPT2 имеют происхождение из многоклеточных организмов. Примеры беспозвоночных клеток включают клетки растений и насекомых, включая, например, различные бакуловирусные штаммы и варианты и соответствующие разрешенные насекомые клетки-хозяева из таких организмов, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка), и *Bombyx mori* (шелковичный червь). Общедоступны различные вирусные штаммы для трансфекции, например, L-1 вариант *Autographa californica* NPV и Bm-5 штамм *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы можно использовать, в особенности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

[00237] Также в качестве хозяев могут использоваться культуры растительных клеток хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата и табака.

[00238] Антитела к ANGPT2 или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению также могут быть инкорпорированы в вирусные векторы, то есть, полинуклеотид, кодирующий антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент, интродуцируют в вирусный вектор и затем экспрессируют в организме пациента после инфицирования вирусом.

[00239] В другом аспекте, экспрессию антител к ANGPT2 осуществляют в клетках позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (тканевая культура) стало обычной процедурой и техники являются широкодоступными. Примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия 5 почек обезьян CV1, трансформированная с помощью SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), линий почки эмбриона человека (293 или 293 клетки, субклонированные для роста в суспензионной культуре, (Graham и др., 1977, J. Gen Virol. 36: 59), клетки почки новорождённого хомяка (BHK, ATCC CCL 10), клетки яичника китайского хомячка/-DHFR1 (CHO, Urlaub и др., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10 77: 4216; например, DG44), клетки Сертоли мышей (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), клетки почки обезьян (CV1 ATCC CCL 70), клетки почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76, ATCC CRL-1587), клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2), клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34), клетки почки крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), 15 клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75), клетки печени человека (Hep G2, HB 8065), опухоль молочной железы мышей (MMT 060562, ATCC CCL51), TR1 клетки (Mather и др., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68), MRC 5 клетки, FS4 клетки, и линия гепатомы человека (Hep G2).

[00240] Клетки-хозяева трансформируют с помощью вышеописанных экспрессионных или клонирующих векторов для продукции антитела к ANGPT2 20 и культивируют в подходящей питательной среде, модифицированной, если это является подходящим, для индуцирования промоторов, отбора трансформантов, или амплификации генов, кодирующих желательные последовательности.

[00241] Клетки-хозяева, используемые для продуцирования антитела к 25 ANGPT2, описанные в настоящей заявке, могут культивироваться в различных питательных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), минимальная питательная среда ((MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.), и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) являются подходящими для 30 культивирования клеток-хозяев. Дополнительно, любая из сред, описанных в одном или нескольких источниках: Ham и др., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes и др., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, патент US № 4,767,704, патент US № 4,657,866, патент US № 4,927,762, патент US № 4,560,655, патент US № 5,122,469, WO 90/103430, и WO 87/00195, может использоваться в качестве

культуральной среды для клеток-хозяев. Любые из этих сред могут быть дополнены, при необходимости, гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или фактор роста эпидермиса), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния, и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как гентамицин), микроэлементами (определяемые как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне), и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Другие добавки также можно включать в подходящих концентрациях, что является очевидным для квалифицированного специалиста в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и другие, представляют собой условия, которые ранее использовались для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут понятными квалифицированному специалисту в данной области техники.

[00242] При использовании рекомбинантных техник, антитело может продуцироваться внутриклеточно, в периплазматическое пространство, или непосредственно секретируется в питательную среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, то клетки могут быть разрушены для высвобождения белка в качестве первой стадии. Отходы в виде частичек, либо клетки-хозяева или лизированные фрагменты, могут быть удалены, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. В Carter и др., 1992, Bio/Technology 10:163-167 описана процедура для выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство E. coli. Вкратце, клеточную массу размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA, и фенилметилсульфонилфторид (PMSF) приблизительно в течение 30 минут. Клеточный дебрис может быть удален путем центрифугирования. Если антитело секретируется в питательную среду, то супернатанты с таких экспрессирующих систем в целом сначала концентрируют, используя коммерчески доступный фильтр для концентрации белка, например, ультрафильтрационный блок Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен в любую из вышеуказанных стадий для ингибирования протеолиза и антибиотики могут быть включены для предотвращения роста случайных загрязнителей. Для выделения антитела из клетки-хозяина можно использовать различные методы.

[00243] Композиция антитела, приготовленная из клеток, может быть очищена, например, путем хроматографии с гидроксипатитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, где типичной техникой очистки является аффинная хроматография. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от видов и изоформа любого домена Fc иммуноглобулина, который присутствует в антителе. Белок А можно использовать для очистки антитела, которые основываются на тяжелых цепях гамма1, гамма2, или гамма4 человека (см., например, Lindmark и др., 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13). Белок G рекомендуется для всех мышечных изоформ и для гамма3 человека (см., например, Guss и др., 1986 EMBO J. 5:1567-1575). Матрицей, к которой присоединен аффинный лиганд, наиболее часто представляет собой агарозу, но доступны также другие матрицы. Механично стабильные матрицы, такие как стекло с заданным размером пор или поли(стиролдивинил)бензол предоставляют возможность более быстрых скоростей потоков и более короткого времени обработки, которого можно достичь с агарозой. Если антитело включает C_{H3} домен, то смола Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) является подходящей для очистки. Также доступны другие технологии для очистки белков, такие как фракционирование на ионо-обменной колонке, осаждение с этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарин SEPHAROSE™ хроматография на анион- или катион-обменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE, и осаждение с сульфатом аммония, в зависимости от восстанавливаемого антитела.

[00244] После любой (ых) подготовительной (ых) стадии (й) очистки, смесь, содержащую представляющее интерес антитело и загрязнители, можно подвергать хроматографии с гидрофобным взаимодействием при низких pH, используя элюирующий буфер при pH в диапазоне 2,5-4,5, типично осуществляют при низких концентрациях соли (например, от приблизительно 0-0,25 M соли).

[00245] Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в расслабленных, умеренных или строгих условиях, как указано в настоящей заявке, со всей или частью (например, частью, которая кодирует переменную область) нуклеотидной последовательности, которая представляет собой выделенную (ые) полинуклеотидную (ые) последовательность (и),

кодирующую (ие) антитело к ANGPT2 или фрагмент антитела. Гибридирующаяся область гибридирующейся нуклеиновой кислоты, как правило, состоит из по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30 или 50) нуклеотидов. Гибридирующаяся область гибридирующейся нуклеиновой кислоты идентична по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 98%, последовательности участка или всей нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид к ANGPT2 (например, вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи), или ее комплементу. Гибридирующие нуклеиновые кислоты описанного в настоящей заявке типа можно использовать, например, в качестве зонда для клонирования, праймера, например, ПЦР-праймера или диагностического зонда.

[00246] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к выделенному (ым) полинуклеотиду или полинуклеотидам, содержащему (им):

последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 31 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 3; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 32 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 8,

или

выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащий (е) последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 33 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 4; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 34 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 9,

или

выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащий (е) последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 35 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 5; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 36 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 10,

или

выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащий (е) последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 37 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 6; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 38 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 11,

или

выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащий (е) последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 39 или вариабельную область тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 7; и последовательность, кодирующую легкую цепь, как представлено в SEQ ID NO: 40 или вариабельную область легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 12.

[00247] Подразумевается, что в указанных антителах к ANGPT2 и фрагментах антител последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей CDR, остаются неизмененными (неизмененными по отношению к аминокислоте, которую они кодируют, возможны эквиваленты ДНК последовательности вследствие вырожденности генетического кода), но окружающие участки, например, FR участки, могут быть сконструированы.

[00248] Изделия

[00249] В другом аспекте, охватывается изделие, содержащее вещества, пригодные для лечения нарушений, описанных выше. Изделие включает контейнер и этикетку. Приемлемыми контейнерами являются, например, бутылки, флаконы, шприцы и лабораторные пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая является эффективной для лечения конкретного состояния, и может иметь стерильное отверстие для доступа. Например, контейнер может представлять собой мешок или флакон для внутривенного раствора, имеющий запирающее устройство, проницаемое для инъекционной иглы для подкожного введения. Действующее вещество в композиции представляет собой антитело к ANGPT2 или его антигенсвязывающий фрагмент. На этикетке на контейнере или связанной с ним указывается, что композиция используется для лечения выбранного состояния. Изделие может дополнительно

включать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно включать другие вещества, присутствие которых желательно с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

[00250] Изобретение описано ниже с помощью представленных примеров, которые не направлены на ограничение объема изобретения.

[00251] Примеры

[00252] Антитела ANGPT2-opt-1, ANGPT2-opt-2, ANGPT2-opt-13, ANGPT2-opt-19, и ANGPT2-opt-31 характеризовали наряду с антителами сравнения аналог nesvacumab, аналог MEDI3617, и LC06. Эти антитела сравнения получают с помощью стандартных процедур на основании опубликованных последовательностей, как описано ниже.

Таблица 4. Антитела сравнения к ANGPT2.

Антитело сравнения	Опубликованная последовательность
Nesvacumab аналог (Regeneron) Тяжелая цепь: SEQ ID NO. 53 Легкая цепь: SEQ ID NO. 54	См. наименование препарата по Справочнику национальных непатентованных названий США (USAN) номер файла ZZ-34 (2012) для nesvacumab. Для аналога nesvacumab, описанного в настоящей заявке, остаток лизина в положении 219 в тяжелой цепи nesvacumab заменяли на аргинин (K219R).
MEDI3617 аналог (Medimmune) Тяжелая цепь: SEQ ID NO. 55 Легкая цепь: SEQ ID NO. 56	Структура аналога MEDI3617, используемого в настоящей заявке, основана на описании в патенте US № 8,507,656.
LC06 (Roche) Тяжелая цепь: SEQ ID NO. 57 Легкая цепь: SEQ ID NO. 58	Структура LC06, используемого в настоящей заявке, основана на описании в патенте US № 9,340,609.

[00253] Данные для этих антител описаны ниже.

[00254] Пример 1: Создание антител (иммунизация)

[00255] Мышей CD1 дикого типа иммунизировали с применением рекомбинантной человеческой и мышинной ДНК ANGPT2, а также человеческого и мышинового белка ANGPT2. Полный адъювант Фрейнда, Неполный адъювант Фрейнда, Titermax, или Gerbu использовали в качестве адъювантов в различные временные точки для увеличения гуморального иммунного ответа. После этого серологию оценивали с помощью ELISA. Отобранные серологически положительные мыши получали конечный бустер перед выделением В-клеток.

Отобранные мыши все проявляли положительные титры антител в сыворотке кроме. После окончания схемы иммунизации, собирали спленоциты для восстановления антиген-специфических В-клеток.

[00256] Пример 2. Получение гуманизированных антител

5 **[00257]** Химерная лидерную CL-209881_VL отбирали для дальнейшей оптимизации. Химерная лидерная имела переменную легкую цепь, соответствующую SEQ ID NO: 2, и переменную тяжелую цепь, соответствующую SEQ ID NO: 1. Тридцать три последовательности (лидерные) отбирали и оптимизировали. Последующие исследования осуществляли для отбора шести антител для дальнейшего получения в увеличенном масштабе.

[00258] Пример 3. Подверженности последовательностей в CDRs

[00259] Последовательности CDR проверяли относительно наличия любых потенциальных подверженностей, таких как сайты N-гликозилирования, сильные мотивы дезамидирования (NG, NS, NH, NA, ND, NT, NN), мотивы изомеризации аспартата (DG), мотивы дефрагментации (DG, DS), цистеин. Эти аминокислоты или мотивы могут подвергаться химической реакции и придавать продукту нежелательную гетерогенность, также с возможностью отрицательного влияния на связывание мишени и функцию. Из этих соображений, является предпочтительным для удаления таких аминокислот или мотивов (при необходимости) из CDR.

[00260] Пример 4. Иммуногенность

[00261] Иммуногенность последовательностей оценивали виртуально с помощью алгоритма, полученного по лицензии от компании EpiVax, Inc., Providence, Rhode Island. Оценка EpiMatrix Treg-adj учитывает эпитопы Т-клеток и эпитопы регуляторных Т-клеток. Чем более низкая оценка иммуногенности, тем меньше вероятность для последовательности быть иммуногенной. В целом, отрицательная оценка рассматривается как низкий риск иммуногенности, в то время как положительная оценка рассматривается как указание потенциальной иммуногенности.

30 **[00262] Пример 5. Информация об эпитопе**

[00263] Материалы

[00264] Вода (Sigma Aldrich, номер по каталогу 37877-4L)

[00265] Ацетонитрил (Sigma Aldrich, номер по каталогу 34998-4L)

[00266] Муравьиная кислота (Fluka, номер по каталогу 94318)

- [00267] Мочевина (Sigma Aldrich, номер по каталогу 51456-500G)
- [00268] ТСЕР-НСl - 10 г (Thermo Scientific - Pierce, номер по каталогу 20491)
- 5 [00269] Двухосновный фосфат натрия (Sigma Aldrich, номер по каталогу S7907-100G)
- [00270] Одноосновный фосфат натрия (Sigma Aldrich, номер по каталогу S8282 - 500G)
- [00271] Предколонка ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard, 130Å, 1,7 мкм, 2,1 мм X 5 мм (Waters Technologies Corp, 186003975)
- 10 [00272] Картридж с иммобилизованным пепсином Poroszyme®, 2,1 мм x 30 мм (Life Technologies Corp, 2313100)
- [00273] Колонка Acquity UPLC BEH C18 1,7 мкм, 1 мм X 50 мм (Waters, 186002344)
- 15 [00274] Растворитель А: 0,1 % Муравьиная кислота /99% вода /1% ацетонитрил
- [00275] Растворитель В: 0,1 % Муравьиная кислота /5% вода /95% ацетонитрил
- [00276] Водный буфер: H₂O 10 mM фосфат натрия pH 7,4
- [00277] Дейтериевый буфер: D₂O 10 mM фосфат натрия pH 7,4
- 20 [00278] Закаливающий буфер: Вода 8 М Мочевина, 0,4М ТСЕР-НСl
- [00279] В контрольных образцах для картирования эпитопов, антиген прогоняли с антителом и без него. Для определения перечня антигенных пептидов, в этом проколе сначала осуществляли первый прогон, используя водный буфер вместо дейтериевого буфера. 4 мкл образца смешивали с 40 мкл дейтериевого буфера. Эту смесь инкубировали при 20°C для нескольких временных точек (1, 2 и 4 минуты). После этого 40 мкл смеси переносили в 40 мкл 4°C закаливающего буфера (4М Мочевина, 0,4М Тсер-НСl) и смешивали. Инъецировали 60 мкл закаливающего белка, где он расщепляется на пепсиновой колонке в течение 2 минут путем промывания 200 мкл/мл растворителя А: 0,1
- 25
- 30 %Муравьиная кислота /99% вода /1% ацетонитрил. Последующие пептиды обессоливали на предколонке Vanguard в течение 3 минут. Расщепленные пепсином пептиды отправляли на колонку с обращенной фазой BEH C18 внутри колонки /клапана терморегулируемого компартмента. Использовали градиент системы растворителей, состоящей из: растворитель А: 0,1 %Муравьиная

кислота /99% вода /1% ацетонитрил и растворитель В: 0,1 % Муравьиная кислота /5% вода /95% ацетонитрил. Процентное содержание растворителя В повышали от 10% до 15% через 5,1 минуты, до 50% через 11 минут, до 90% через 11,5 минуты, выдерживая до 12,5 минут, до 0% В через 13 минут, выдерживая до 14 минут. Хроматографическое разделение происходило при 4°C при скорости потока 180 мкл/мин. После хроматографического разделения образец поступал на Thermo Scientific Orbitrap Fusion масс-спектрометр, работающий в режиме положительной электрораспылительной ионизации. Используемый метод включал активационные типы CID и ETD при идентификации контрольных пептидов, используя разделение 120 тыс., минимальный сигнал 10 тыс., ширину выделения 1,0 и нормированную энергию столкновений 35,0 В. RF уровень S-линз устанавливали на 60%. Для контрольных пептидов тип сбора данных представлял собой профили для полного MS сканирования и центроид для CID MS/MS данных. Для дейтерированных образцов, не собирали MS /MS. Данные собирали для массового диапазона 280-1800 Да. Для анализа необработанных данных ЖХ-МС /МС фрагментации, контрольные образцы (с CID и ETD MS/MS) анализировали, используя Proteome Discover 1.4 (Thermo Scientific) и PMi Byonic (Protein Metrics) по отношению к заданной последовательности для создания перечня пептидов и времени удерживания. Файлы с необработанными данными предварительно обрабатывали и превращали в ASCII формат, используя собственное разработанное программное обеспечение SHARC. После этого отмечали идентифицированные пептиды и обобщали полученные данные, используя собственное разработанное программное обеспечение SHAFT. Эпитопы определяли на основании отличий сдвига средней массы, индуцированного связыванием после мечения дейтерием. На уровне пептида, защита больше 0,4 Да рассматривалась как достоверная.

[00280] Результаты картирования эпитопов представлены для иллюстративного антитела согласно изобретению (ANGPT2-opt-13) (Фигура 2), аналога nesvacumab, аналога MED3617 и LC06. Nesvacumab предположительно перекрестно не реагирует с ANGPT1, в то время как аналог MED3617 и LC06 предположительно перекрестно реагирует с ANGPT1. Сайты специфического связывания антител с FLD доменом ANGPT2 человека с последовательностью SEQ ID NO: 50 (Фигура 2) выделены темно-серым. Представленные данные

указывают на то, что антитела сравнения (аналог nesvacumab, MED3617, и LC06) связываются с эпитопами, которые являются разными и отличаются от эпитопа связывания ANGPT2-opt-13.

[00281] Пример 6. CDC анализ

5 **[00282]** Fc область тяжелой цепи IgG придает эффекторные функции антителу посредством взаимодействия с C1q и, следовательно, может иметь способность индуцировать комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Этот эффект можно исследовать в условиях *in vitro* путем подвергания клеток-мишеней воздействию комплемента в присутствии антитела, которое
10 специфически связывается с клеткой-мишенью. CDC анализ можно использовать для оценки активности моноклональных антител опосредовать CDC. (См. «Mapping of the C1q binding site on Rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc,» Idusogie, Esohe E. и др., *Journal of Immunology* (2000), 164 (8), 4178-4184; и “Utilization of Complement-Dependent Cytotoxicity To Measure Low Levels of
15 Antibodies: Application to Nonstructural Protein 1 in a Model of Japanese Encephalitis Viruss,» Konishi, Eiji и др., *Clin Vaccine Immunol.* (2008) Jan; 15(1): 88–94.)

[00283] CHO клетки, экспрессирующие связанный с мембраной ANGPT2 человека (CHO-GPI-ANGPT2), культивировали в RPMI-1640 с добавлением HI
20 FBS, 1x glutamax, и 1000 мкг/мл Генетицина (используемого в качестве клеток-мишеней). CDC активность определяли путем измерения высвобождения LDH из клеток-мишеней, используя Cytotoxicity Detection Kit Plus от Roche®. Образцы готовили в трех повторах в планшетах с круглым дном на 96 лунок. Образцы состояли из 50 мкл антитела, 50 мкл клеток-мишеней (50000/лунку), и 100 мкл
25 комплемента человека (Cedarlane®), при конечном разведении 1:12 в среде для анализа цитотоксичности (Cedarlane®). Фоновый контроль представлял собой только 200 мкл среды для анализа цитотоксичности (Cedarlane®). Контроль максимального высвобождения (Tmax) представлял собой 50 мкл клеток-мишеней и 150 мкл среды для анализа цитотоксичности. Контроль клеток-
30 мишеней (Tspon) представлял собой 50 мкл клеток-мишеней и 150 мкл среды для анализа цитотоксичности. Планшет инкубировали при 37°C в инкубаторе с влажным CO₂ в течение 3 часов. За тридцать минут до окончания инкубирования (после инкубирования с течение 2,5 часов), 10 мкл лизирующего раствора (обеспечиваемого в Cytotoxicity Detection Kit-Roche®) добавляли к лункам с

контролем максимального высвобождения (Tmax). После окончания инкубирования, 100 мкл супернатантов переносили в соответствующие лунки планшета с плоским дном на 96 лунок для обнаружения LDH. 100 мкл реакционной смеси (обеспечиваемой в Cytotoxicity Detection Kit) добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут в темноте. После окончания этого второго инкубирования, реакцию останавливали путем добавления 50 мкл стоп-раствора (обеспечиваемого в Cytotoxicity Detection Kit). Абсорбцию измеряли при длине волны 490 нм с 650 нм в качестве эталона на Biotek® планшет-ридере (Biotek, Synergy). CDC% рассчитывали с помощью уравнения:

[00284]
$$\%CDC = ((Ab \text{ индуцированное высвобождение}) - (T_spon)) / ((T_max) - (T_spon)) * 100$$

[00285] Вышеописанное CDC исследование использовали для определения цитотоксичностей, вызываемых антителами к ANG: ANGPT2-opt-13-IgG, аналог nesvacumab, MEDI3617 аналог, и LC06. Результаты исследований в двух повторах представлены на Фигурах 1A и 1B. Результаты свидетельствуют о том, что иллюстративное антитело к ANGPT2 согласно изобретению (ANGPT2-opt-13-IgG) является менее токсичным, чем каждое из аналога nesvacumab, MEDI3617 аналога, и LC06.

[00286] Пример 7. ANGPT2 Блокирующий анализ

[00287] ANGPT2 димер человека (CC-FLD) предварительно инкубировали с тестируемыми антителами. Затем смесь ANGPT2/Антитело инкубировали с HEK293 человеческими Tie2 клетками при 4°C. После промывания, клетки окрашивали помощью анти-His-AF647 (от GenScript) для обнаружения His-метки на ANGPT2 белке. Связывание вторично меченного ANGPT2 с человеческими Tie2 клетками обнаруживали с помощью проточной цитометрии. Усредненные значения из двух повторов для каждой точки концентрации использовали для построения графиков подборок кривых. Антитела, которые защищают ANGPT2 от связывания с Tie2 клетками, рассматривали как блокирующие антитела. Результаты представлены на Фигурах 3A-3G и EC50 значения представлены в Таблице 5 на основании среднего из значений в двух повторах.

Таблица 5. ANGPT2 блокирующий анализ.

Антитело к ANGPT2	EC50, нМ
Ang2-opt-1	13,22
Ang2-opt-2	14,81
Ang2-opt-13	12,98
Ang2-opt-19	15,08
Ang2-opt-31	13,03
Аналог Nevescumab	3,77

[00288] Результаты ANGPT2 блокирующего анализа свидетельствуют о том, что антитела согласно изобретению блокируют ANGPT2 взаимодействие с рецептором Tie2 на клеточной поверхности.

[00289] Пример 8. Функциональный анализ Tie2 фосфорилирования

[00290] Функциональный анализ Tie2 фосфорилирования осуществляли, как описано ниже.

[00291] Если специально не указано иначе, то использовали следующие реагенты или материалы:

[00292] HEK293/huTie2 клетки;

[00293] 0,25 % трипсин/EDTA (№ по каталогу Gibco 25200-056);

[00294] Планшет с черным прозрачным дном на 96 лунок, покрытый поли-D-лизином (BioCoat № по каталогу 35460);

[00295] PathScan Sandwich ELISA лизирующий буфер (Cell Signaling, № по каталогу 7018);

[00296] Коктейль ингибиторов HALT протеазы и фосфатазы (Thermo Scientific, № по каталогу 78443, № партии QK226996, 100х маточный);

[00297] Активированный ортованадат натрия, 200 мМ маточный раствор (Five photon, № по каталогу ActVO-4, № партии 26716-4);

[00298] Прозрачные полистирольные микропланшеты на 96 лунок с высоким связыванием (R&D Systems № по каталогу DY990, № партии 316940);

[00299] ELISA блокирующий буфер: Забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) мас/2 % BSA, разведенный из 10 % маточного раствора (R&D Systems, № по каталогу DY995);

[00300] Разбавитель для анализа ELISA: PBS мас/1 % BSA, разведенный из 10 % маточного раствора (R&D Systems, № по каталогу DY995);

[00301] Концентрат промывочного буфера ELISA: 25X маточный (R&D Systems, № по каталогу WA126);

- [00302] Упакованный реагент для субстрата ELISA (R&D Systems, кат. DY999);
- [00303] ELISA стоп-раствор (R&D Systems, кат DY994); и
- [00304] rhАнгиопоэтин-2 (R&D systems кат. 623-AN/CF; № партии SUL61
- 5 при 169 мкг/мл маточного раствора).
- [00305] *Среда для выращивания клеток:*
- [00306] Модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM) с 4,5 г/л Глюкозы с L-Глутамином (500 мл) (№ по каталогу Gibco 11995-065);
- [00307] Фетальная бычья сыворотка (FBS) (50 мл) (Hyclone кат.
- 10 SH30071.03, № партии AC10219630);
- [00308] 100 mM раствор заменимых аминокислот (NEAA) (5 мл) (Gibco: № по каталогу 11140-050);
- [00309] 100 mM пирувата натрия (5 мл) (Gibco № по каталогу 11360-070);
- [00310] PenStrep (5 мл) (№ по каталогу Gibco 15140-122); и
- 15 [00311] 1M N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этан сульфоновая кислота (Nepes) (6,25 мл) (№ по каталогу Gibco 15630-080); Генетицин (10 мл) (Gibco № по каталогу 10131-035).
- [00312] *Обедненная среда:*
- [00313] DMEM с 4,5 г/л Глюкозы с L-Глутамином;
- 20 [00314] FBS (25 мл) 5%; NEAA (5 мл);
- [00315] Пируват натрия (5 мл); PenStrep (2,5 мл);
- [00316] Nepes (6,25 мл); и
- [00317] Генетицин (10 мл) Фосфатно-солевой буфер Дульбекко (dPBS), без кальция и магния (№ по каталогу Gibco14190).
- 25 [00318] *Выращивание клеток*
- [00319] НЕК293/huTie2 клетки промывали с PBS, отсоединяли с помощью 0,25% Трипсина, и подсчитывали, используя устройство для подсчёта клеток countess (Invitrogen). 5×10^4 клеток высевали на лунку в планшет для культивирования тканей на 96 лунок с прозрачным дном с Ploy D-Лизином в 100
- 30 мкл модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с 10 %FBS, NEAA, Пируватом натрия, PenStrep , Генетицином и NEPES. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ инкубатор. Приблизительно через 18 часов, среды для выращивания клеток заменяли на 100 мкл обедненной среды (Модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM) с 5 %

FBS, NEAA, Пируватом натрия, PenStrep, Генетицином и HEPES, возвращали планшет в инкубатор, и инкубировали в течение ночи.

[00320] *Покрывание планшета ELISA*

[00321] Захваченное антитело (антиTie2 (AB33) от Cell signalling) разводили до 1 мкг/мл рабочего раствора в буфере для покрытия (eBioscience). Рабочий раствор сразу добавляли в полистирольный микропланшет на 96 лунок с высоким связыванием (R&D) для получения 100 мкл на лунку. Лунки запечатывали и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали 3 раза с помощью 300 мкл на лунку с применением 1XELISA промывочного буфера и затем блокировали с помощью 200 мкл блокирующего буфера в течение 2 часов при комнатной температуре, в то же время встряхивая.

[00322] *Обработка клеток*

[00323] Маточный раствор Ang2 (rhАнгиопоэтин-2 от R&D systems № по каталогу 623-AN/CF; № партии SUL61) разводили до 6 мкг/мл в обедненной среде. (Обедненную среду также использовали в качестве разбавителя антитела.) Отдельно, приготавливали растворы антител к ANGPT2 путем разведения до 66 нМ с последующим серийным разведением 1:3 до 0,27 нМ. Антитела к ANGPT2 с rhAng2 инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Среду для культивирования клеток (50 мкл) удаляли из каждой лунки в клеточном планшете. Клетки обрабатывали с помощью 50 мкл аликвот предварительного инкубированного раствора антитела к ANGPT2 в течение 20 минут при 37°C, 5% CO₂ инкубатор. Супернатант отбрасывали и клетки промывали один раз с применением холодного PBS (содержащего 1 мМ активированный ортованадат натрия). Промывочный буфер отбрасывали и к каждой клетке добавляли PathScan лизирующий буфер (cell signaling) с 1 мМ активированным ортованадатом натрия, ингибиторами протеазы и фосфатазы). Планшет встряхивали при быстрой скорости в течение 1-3 часов при 4°C.

[00324] *ELISA*

[00325] Блокирующий буфер удаляли из ELISA планшета, в каждую лунку добавляли клеточный лизат, и планшет инкубировали в течение ночи при 4°C со встряхиванием. Планшет промывали четыре раза с помощью промывочного буфера ELISA, и каждую лунку обрабатывали с антителом для обнаружения: Biotin Conjugate-4G10 platinum anti-Phosphotyrosine (от Millipore) при разведении 1:300 в разбавителе для анализа ELISA. Планшет инкубировали в течение 2

часов на стряхивателе при комнатной температуре и затем промывали четыре
 раза с применением промывочного буфера ELISA. В каждую лунку добавляли
 Стрептавидин-конъюгат HRP (от Millipore), разведенный при 1:300 в
 разбавителе для анализа ELISA, и инкубировали на стряхивателе в течение 1
 5 часа при комнатной температуре. Планшет промывали четыре раза с
 промывочным буфером ELISA. После стадии промывки, в каждую лунку
 добавляли субстратный раствор из упаковки реагента для субстрата ELISA (R&D
 Systems) при комнатной температуре в течение 5-10 минут. Стоп-раствор
 добавляли с последующим осторожным постукиванием в течение 5 минут для
 10 обеспечения полного смешивания. После этого планшет анализировали на
 планшет-ридере с абсорбцией при 450 нм, скорректированной с 650 нм.

Таблица 6. Функциональный анализ Tie2 фосфорилирования.

Антитело к ANGPT2	EC50, нМ	EC50, нМ
Ang2-opt-1	3,0	3,2
Ang2-opt-2	1,8	1,9
Ang2-opt-13	4,2	4,0
Ang2-opt-19	5,0	4,6
Ang2-opt-31	4,4	3,8
Ang2-opt-34	5,8	7,4
Аналог Nevescumab	4,4	2,2
Аналог MEDI3617	-	2,7
LC06	1,3	-

[00326] Результаты Tie2 функционального анализа свидетельствуют о том,
 15 что антитела к ANGPT2 ингибируют ANGPT2-индуцированное Tie2
 фосфорилирование и могут блокировать Tie2-опосредованное
 фосфорилирование и нижерасположенную передачу сигналов.

[00327] Пример 9. Связывающая аффинность

[00328] Связывающую аффинность к различным ANGPT2 анализам
 20 определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя
 ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Если специально не указано иначе, все реагенты
 получали от Bio-Rad. Подвижный буфер для всех анализов и разведений (за
 исключением тех случаев, когда конкретно указано) представлял собой
 забуференный фосфатом физиологический раствор
 25 (PBS)/этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) с 0,01% Tween20 (PBS-T-
 EDTA). PBS-T-EDTA приготавливали путем добавления 100 мкл 100% Tween20
 к 2 л PBS-T-EDTA с исходной концентрацией 0,005% Tween20 для получения

конечной концентрации Tween20 0,01%. Сенсорный чип общей
линеаризованной модели (GLM) нормировали, предварительно обрабатывали, и
активировали с помощью уравновешенной смеси 1-этил-3-[3-
диметиламинопропил] карбодиимид (EDC)/N-гидроксисульфосукцинимид (s-
NHS) в горизонтальном направлении в течение 300 секунд при скорости потока
30 мкл/мин. После этого осуществляли иммобилизацию с рекомбинантным
белком A/G (Thermo Scientific) (60 мкг/мл в 10 mM ацетате pH 4,5) в
горизонтальном направлении в течение 300 секунд при скорости потока 30
мкл/мин, что приводило приблизительно к 4370-4875 единиц ответа (ЕО) Белка
A/G на поверхности. После этого сенсорный чип деактивировали с помощью 1M
этанолламин HCl в горизонтальном направлении в течение 300 секунд при
скорости потока 30 мкл/мин. Сенсорный чип стабилизировали в течение 18 с
0,85% фосфорной кислоты при скорости потока 100 мкл/мин 3 раза
горизонтально и 3 раза вертикально.

[00329] Каждое ANGPT2 антитело захватывали на поверхность Белка A/G
вертикально в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин, что приводило к
уровню захвата приблизительно 2500 ЕО. Исходные условия стабилизировали
путем инъектирования PBS-T-EDTA в течение 60 с при скорости потока 100
мкл/мин горизонтально с диссоциацией 120 с. Аналит (например, HuANGPT2)
инъектировали горизонтально над захваченным антителом в течение 300 с при
скорости потока 30 мкл/мин и диссоциации с течением 1800 с. Концентрации
аналитов составляли 0 нМ, 6,25 нМ, 12,5 нМ, 25 нМ, 50 нМ и 100 нМ.
Поверхность регенерировали путем инъектирования 0,85% фосфорной кислоты в
течение 18 с при скорости потока 100 мкл/мин один раз горизонтально и один
раз вертикально. PBS-T-EDTA инъектировали в течение 60 с при скорости
потока 100 мкл/мин один раз вертикально и один раз горизонтально.

[00330] Взаимные помехи (взаимодействия с поверхностью сенсора) и
холостые данные (PBS-T-EDTA с 0,01% Tween20 или 0 нМ аналита (в данной
случае HuANGPT2)) вычитали из необработанных данных. После этого
сенсограммы подгоняли глобально к 1:1 связыванию Ленгмюра, получая
значения ассоциации (k_a), диссоциации (k_d) и аффинности (K_D).

[00331] Вышеописанную процедуру использовали для измерения
связывающей аффинности со следующими аналитами: ANGPT1 человека,
ANGPT2 человека, ANGPT2 яванской макаки (суно), ANGPT2 кролика, и

ANGPT2 крысы. Для антител к ANGPT2 согласно изобретению и аналога nesvacumab, не наблюдали связывания с ANGPT1 человека ($K_D > 100$ нМ). Результаты связывания с ANGPT2 человека и суно ANGPT2 представлены в Таблице 7.

- 5 **[00332]** Таблица 7. Свойства аффинного связывания антител к ANGPT2 на моделях человека и яванской макаки (суно).

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)
	ANGPT2 человека			суно ANGPT2		
CL_209881	1,51E+05	2,34E-05	0,155	1,64E+05	3,93E-05	0,240
ANGPT2-opt-1	1,44E+05	4,25E-05	0,294	1,52E+05	5,48E-05	0,360
ANGPT2-opt-2	1,25E+05	8,11E-05	0,649	1,35E+05	8,45E-05	0,626
ANGPT2-opt-13	1,32E+05	1,89E-05	0,144	1,42E+05	2,08E-05	0,146
ANGPT2-opt-19	8,18E+04	5,83E-05	0,712	8,77E+04	7,40E-05	0,844
ANGPT2-opt-31	1,25E+05	1,14E-05	0,091	1,35E+05	1,96E-05	0,145
аналог Nesvacumab	1,48E+05	1,93E-05	0,130	1,51E+05	1,93E-05	0,128
аналог MEDI3617	6,14E+05	1,66E-02	27	НД	НД	НД
LC06	1,05E+05	1,25E-02	12	НД	НД	НД

НД = недоступно /не измеряли

- 10 **[00333]** Для исследований, проведенных на модели ANGPT2 кролика, ANGPT2-opt-13 и аналог nesvacumab проявляет значения K_D 0,133 нМ и 0,137 нМ, соответственно.

[00334] Для исследований, проведенных на крысиной модели, антитела к ANGPT2 согласно изобретению проявляют только слабое связывание ($K_D \geq 118$ нМ), в то время как аналог nesvacumab проявляет значение K_D 0,159 нМ.

- 15 **[00335]** Полученные результаты свидетельствуют о том, что антитела к ANGPT2 согласно изобретению имеют высокую аффинность к ANGPT2 человека и не имеют измеримой аффинности к ANGPT1 человека.

[00336] Настоящее раскрытие охватывает, в частности, следующие объекты:

- 20 Вариант осуществления 1: Антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент, содержащее (ий):
 переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную
 25 последовательность SEQ ID NO. 17 (H-CDR3), и

- вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 19 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 22 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3),
- 5 или
- вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 14 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 17 (H-CDR3); и
- 10 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 19 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 22 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3),
- или
- 15 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16 (H-CDR3); и
- вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную
- 20 последовательность SEQ ID NO. 20 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 23 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3),
- или
- 25 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16 (H-CDR3); и
- вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную
- 30 последовательность SEQ ID NO. 21 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 23 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 25 (L-CDR3),
- или
- вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную

последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16 (H-CDR3); и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 20 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 22 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3).

Вариант осуществления 2: Антитело к ANGPT2 варианта осуществления 1, где указанное антитело содержит вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 8, соответственно; SEQ ID NO. 4 и SEQ ID NO. 9, соответственно; SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 10, соответственно; SEQ ID NO. 6 и SEQ ID NO. 11, соответственно; или SEQ ID NO. 7 и SEQ ID NO. 12, соответственно.

Вариант осуществления 3: Антитело к ANGPT2 варианта осуществления 2, где указанное антитело содержит вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотным последовательностям SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 8, соответственно; SEQ ID NO. 4 и SEQ ID NO. 9, соответственно; SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 10, соответственно; SEQ ID NO. 6 и SEQ ID NO. 11, соответственно; или SEQ ID NO. 7 и SEQ ID NO. 12, соответственно.

Вариант осуществления 4: Антитело к ANGPT2 варианта осуществления 1, где указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие SEQ ID NO. 31 и SEQ ID NO. 32, соответственно; SEQ ID NO. 33 и SEQ ID NO. 34, соответственно; SEQ ID NO. 35 и SEQ ID NO. 36; соответственно; SEQ ID NO. 37 и SEQ ID NO. 38; соответственно; или SEQ ID NO. 39 и SEQ ID NO. 40.

Вариант осуществления 5: Антитело к ANGPT2 варианта осуществления 4, где указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотным последовательностям SEQ ID NO. 31 и SEQ ID NO. 32, соответственно; SEQ ID NO. 33 и SEQ ID NO. 34, соответственно; SEQ ID NO. 35 и SEQ ID NO. 36; соответственно; SEQ ID NO. 37 и SEQ ID NO. 38; соответственно; или SEQ ID NO. 39 и SEQ ID NO. 40.

Вариант осуществления 6: Антитело к ANGTP2 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с одним из вариантов

осуществления 1 - 5, где антитело к ANGTP2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком SEQ ID NO: 51, или к SEQ ID NO: 51.

5 Вариант осуществления 7: Антитело к ANGTP2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей FLD домена ANGPT2 человека с последовательностью SEQ ID NO: 51, или к SEQ ID NO: 51.

10 Вариант осуществления 8: Антитело к ANGTP2 или его антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с SEQ ID No: 51 с антителом к ANGTP2 в соответствии с одним из вариантов осуществления 1 - 7.

Вариант осуществления 9: Выделенный полинуклеотид, имеющий последовательность, которая кодирует антитело, как определено в одном из вариантов осуществления 1 - 8.

15 Вариант осуществления 10: Вектор, содержащий полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 9.

Вариант осуществления 11: Клетка-хозяин, трансформированная или трансфектированная полинуклеотидом в соответствии с вариантом осуществления 9 или вектором в соответствии с вариантом осуществления 10.

20 Вариант осуществления 12: Способ получения антитела в соответствии с одним из вариантов осуществления 1 - 8, включающий (а) культивирование клетки-хозяина в соответствии с вариантом осуществления 11 в условиях, предоставляющих возможность экспрессии антитела в соответствии с одним из вариантов осуществления 1 - 8 и (б) восстановление продуцированного антитела
25 из культуры.

Вариант осуществления 13: Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с одним из вариантов осуществления 1 - 8, и фармацевтически приемлемый носитель.

30 Вариант осуществления 14: Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 13, где композиция дополнительно содержит второе выбранное терапевтическое средство.

Вариант осуществления 15: Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 13 или 14, где композицию вводят с помощью парентерального пути, внутривенного пути или подкожного пути введения.

Вариант осуществления 16: Антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с одним из вариантов осуществления 1 - 8 для применения в качестве лекарственного средства.

5 Вариант осуществления 17: Способ лечения заболеваний или нарушений, которые могут быть облегчены путем лечения антителом к ANGPT2, где способ включает введение пациенту, который в этом нуждается, фармацевтически эффективного количества антитела к ANGPT2 или антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с одним из вариантов осуществления 1 - 8.

10 Вариант осуществления 18: Антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с одним из вариантов осуществления 1 - 8 для применения для лечения заболеваний или нарушений, которые могут быть облегчены путем лечения антителом к ANGPT2.

15 Вариант осуществления 19: Применение антитела к ANGPT2 или антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 8 для приготовления лекарственного средства для лечения заболеваний или нарушений, которые могут быть облегчены путем лечения антителом к ANGPT2.

20 Вариант осуществления 20: Способ варианта осуществления 17, антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент варианта осуществления 18, или применение антитела к ANGPT2 или антигенсвязывающего фрагмента варианта осуществления 19, где заболевание или нарушение выбирают из группы, включающей гипертрофию сердца, инфаркт миокарда, ишемию, ишемическое реперфузионное повреждение, удар гипертензию, легочную артериальную гипертензию, идиопатическую легочную артериальную гипертензию, нарушения мозговой деятельности, индуцированные травмой, астму, хроническое
25 обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, гипертензию, вызванной беременностью и преэклампсией, сепсис, тяжёлый сепсис, септический шок, неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз, болезнь минимальных изменений, фокально-сегментарный гломерулосклероз (FSGS),
30 нефротический синдром, диабетическое заболевание почек (DKD), хроническую болезнь почек (CKD), диабетическую почечную недостаточность, терминальную стадию почечной недостаточности, ишемию или ишемическое реперфузионное повреждение, злокачественное новообразование, гепатоцеллюлярную карциному, идиопатический фиброз лёгких (IPF), эмфизему, острое повреждение

лёгких (ALI), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), тяжёлый острый респираторный синдром (SARS), ближневосточный респираторный синдром (MERS), повышенную проницаемость сосудов (и ассоциированные нарушения), острое повреждение почек, почечно-клеточную карциному, сердечную недостаточность, волчаночный нефрит, синдром Рейно, панкреатит, заболевание периферических артерий, врождённое заболевание сердца, вирус Денге, малярию, хантавирус, отек, регенерацию, волчанку, интерстициальное заболевание легких, склеродерму, ретинопатии, диабетическую нефропатию, портальную гипертензию, рост варикозов и пересадку печени

5
10
15
Вариант осуществления 21: Способ варианта осуществления 20, антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент варианта осуществления 20, или применение антитела к ANGPT2 или антигенсвязывающего фрагмента варианта осуществления 20, где заболевание или нарушение выбирают из группы, включающей хроническое заболевание почек, неалкогольный стеатогепатит (NASH), и сепсис.

Вариант осуществления 22: Способ варианта осуществления 17 или 20, который дополнительно включает введение выбранного второго терапевтического средства.

20
Вариант осуществления 23: Способ варианта осуществления 17 или 20, где указанное антитело вводят с помощью парентерального пути, внутривенного пути или подкожного пути введения.

Вариант осуществления 24: Способ блокирования функции ANGPT2 человека у пациента-человека, который включает введение указанному пациенту-человеку композиции, содержащей антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с одним из вариантов осуществления 1 - 8 в количестве, достаточном для блокирования ANGPT2 опосредованного ответа у указанного пациента-человека.

25
30
Вариант осуществления 25: Антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с одним из вариантов осуществления 1 - 8 для применения для блокирования функции ANGPT2 человека.

Вариант осуществления 26: Применение антитела к ANGPT2 или антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с одним из вариантов осуществления 1 - 8 для приготовления лекарственного средства для блокирования функции ANGPT2 человека.

Вариант осуществления 27: Выделенный полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, где аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи содержит любую из SEQ ID NO: 3 - 7, SEQ ID NO: 13 - 17; SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 39; и где аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи содержит любую из SEQ ID NO: 8 - 12, SEQ ID NO: 19 - 26, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент, содержащее (ий):

- 5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 17 (H-CDR3), и
- 10 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 19 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 22 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3),
- или
- 15 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 14 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 17 (H-CDR3); и
- 20 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 19 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 22 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3),
- или
- 25 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16 (H-CDR3); и
- 30 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 20 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 23 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3),
- или
- вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную

последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16 (H-CDR3); и
вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 21 (L-CDR1); аминокислотную
5 последовательность SEQ ID NO. 23 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 25 (L-CDR3),
или
вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 13 (H-CDR1); аминокислотную
10 последовательность SEQ ID NO. 15 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 16 (H-CDR3); и
вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 20 (L-CDR1); аминокислотную
последовательность SEQ ID NO. 22 (L-CDR2); и аминокислотную
15 последовательность SEQ ID NO. 24 (L-CDR3).

2. Антитело к ANGPT2 по пункту 1, где указанное антитело содержит
вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие
аминокислотные последовательности SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 8,
20 соответственно; SEQ ID NO. 4 и SEQ ID NO. 9, соответственно; SEQ ID NO. 5 и
SEQ ID NO. 10, соответственно; SEQ ID NO. 6 и SEQ ID NO. 11, соответственно;
или SEQ ID NO. 7 и SEQ ID NO. 12, соответственно.

3. Антитело к ANGPT2 по пункту 1, где указанное антитело содержит
25 тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие SEQ ID NO. 31 и SEQ ID NO. 32,
соответственно; SEQ ID NO. 33 и SEQ ID NO. 34, соответственно; SEQ ID NO.
35 и SEQ ID NO. 36; соответственно; SEQ ID NO. 37 и SEQ ID NO. 38;
соответственно; или SEQ ID NO. 39 и SEQ ID NO. 40.

30 4. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к ANGPT2 или
антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 3, и фармацевтически
приемлемый носитель.

5. Антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 3 для применения в качестве лекарственного средства.

5 6. Способ лечения заболеваний или нарушений, которые могут быть облегчены путем лечения антителом к ANGPT2, где способ включает введение пациенту, который в этом нуждается, фармацевтически эффективного количества антитела к ANGPT2 или антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 3.

10 7. Антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 3 для применения для лечения заболеваний или нарушений, которые могут быть облегчены путем лечения антителом к ANGPT2.

15 8. Применение антитела к ANGPT2 или антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 3 для приготовления лекарственного средства для лечения заболеваний или нарушений, которые могут быть облегчены путем лечения антителом к ANGPT2.

20 9. Способ по пункту 6, антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент по пункту 7, или применение антитела к ANGPT2 или антигенсвязывающего фрагмента по пункту 8, где заболевание или нарушение выбирают из группы, включающей гипертрофию сердца, инфаркт миокарда, ишемию, ишемическое реперфузионное повреждение, удар гипертензию, легочную артериальную гипертензию, идиопатическую легочную артериальную гипертензию, нарушения мозговой деятельности, индуцированные травмой, астму, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, гипертензию, вызванной беременностью и преэклампсией, сепсис, тяжёлый сепсис, септический шок, неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз, болезнь
25 минимальных изменений, фокально-сегментарный гломерулосклероз (FSGS), нефротический синдром, диабетическое заболевание почек (DKD), хроническую болезнь почек (CKD), диабетическую почечную недостаточность, терминальную стадию почечной недостаточности, ишемию или ишемическое реперфузионное повреждение, злокачественное новообразование, гепатоцеллюлярную
30

карциному, идиопатический фиброз лёгких (IPF), эмфизему, острое повреждение лёгких (ALI), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), тяжёлый острый респираторный синдром (SARS), ближневосточный респираторный синдром (MERS), повышенную проницаемость сосудов (и ассоциированные нарушения), острое повреждение почек, почечно-клеточную карциному, сердечную недостаточность, волчаночный нефрит, синдром Рейно, панкреатит, заболевание периферических артерий, врождённое заболевание сердца, вирус Денге, малярию, хантавирус, отек, регенерацию, волчанку, интерстициальное заболевание легких, склеродерму, ретинопатии, диабетическую нефропатию, портальную гипертензию, рост варикозов и пересадку печени.

10. Способ по пункту 9, антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент по пункту 9, или применение антитела к ANGPT2 или антигенсвязывающего фрагмента по пункту 9, где заболевание или нарушение выбирают из группы, включающей хроническое заболевание почек, неалкогольный стеатогепатит (NASH), диабетическую нефропатию, сепсис и повышенную проницаемость сосудов.

11. Способ по пункту 9, антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент по пункту 9, или применение антитела к ANGPT2 или антигенсвязывающего фрагмента по пункту 9, где заболевание или нарушение выбирают из группы, включающей ALI, ARDS, SARS, MERS, и повышенную проницаемость сосудов (и ассоциированные нарушения).

12. Способ по пункту 6 или 9, который дополнительно включает введение второго терапевтического средства.

13. Способ по пункту 6 или 9, где указанное антитело вводят с помощью парентерального пути, внутривенного пути или подкожного пути введения.

14. Способ блокирования функции ANGPT2 человека у пациента-человека, который включает введение указанному пациенту-человеку композиции, содержащей антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент по одному

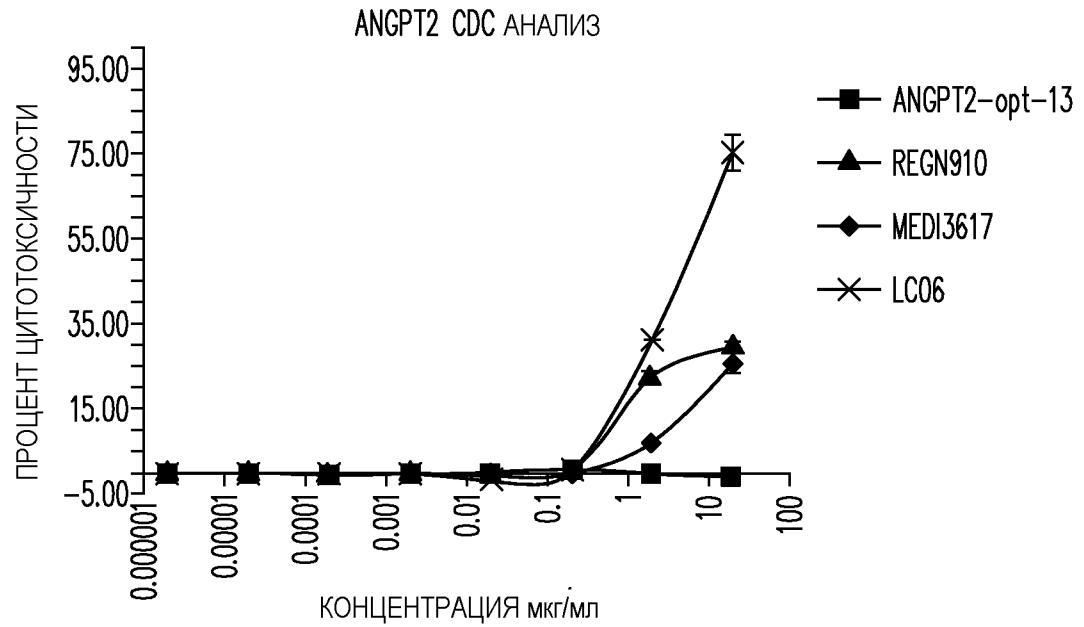
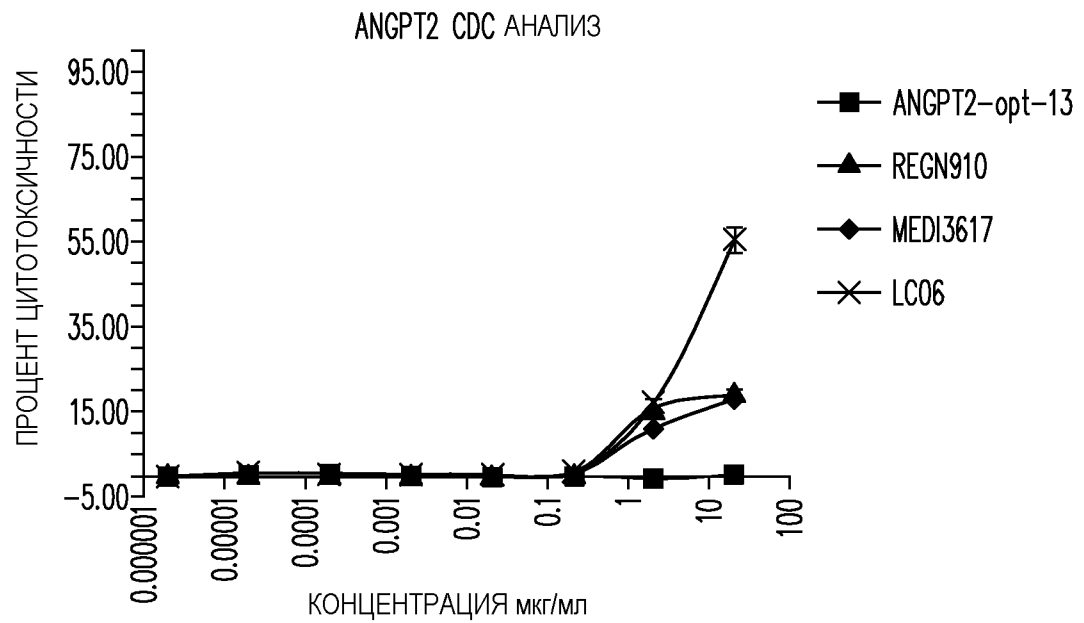
из пунктов 1 - 3 в количестве, достаточном для блокирования ANGPT2 опосредованного ответа у указанного пациента-человека.

5 15. Антитело к ANGPT2 или антигенсвязывающий фрагмент по одному из пунктов 1 - 3 для применения для блокирования функции ANGPT2 человека.

16. Применение антитела к ANGPT2 или антигенсвязывающего фрагмента по одному из пунктов 1 - 3 для приготовления лекарственного средства для блокирования функции ANGPT2 человека.

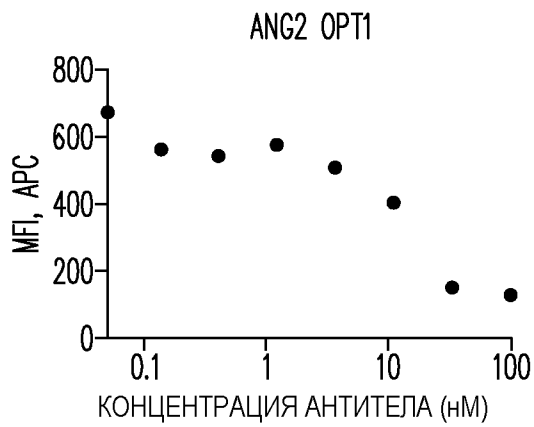
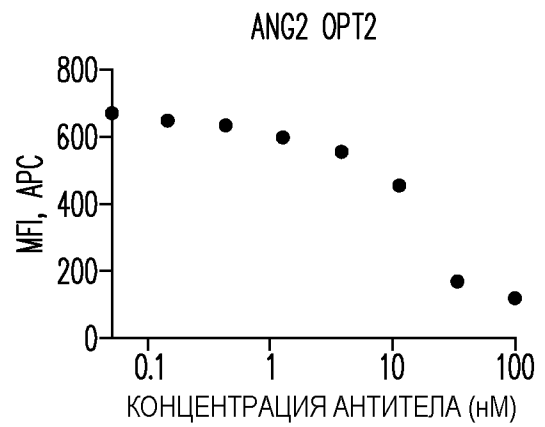
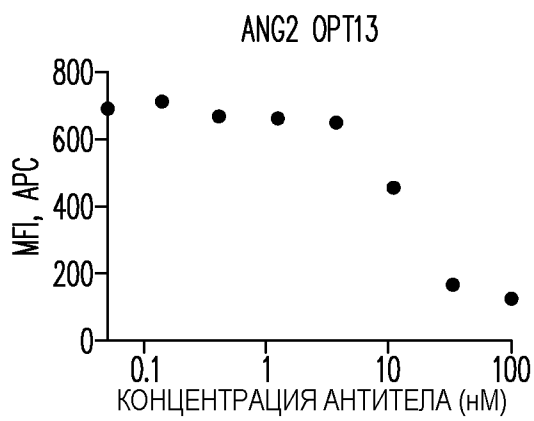
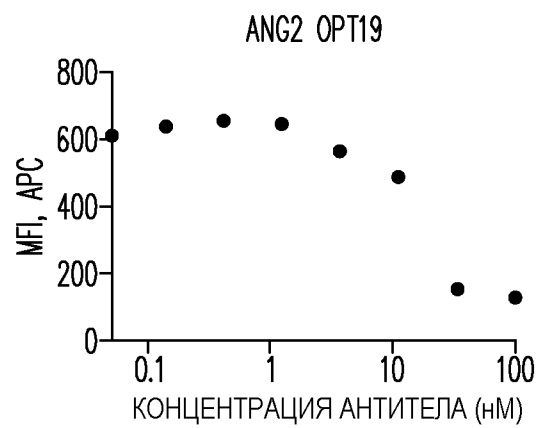
10

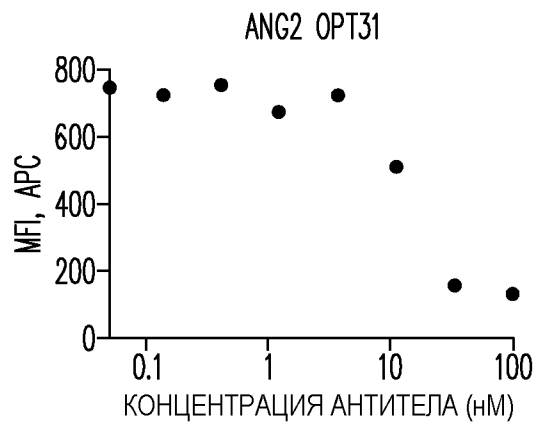
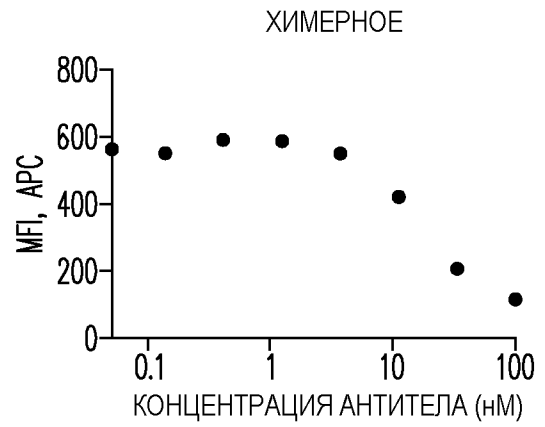
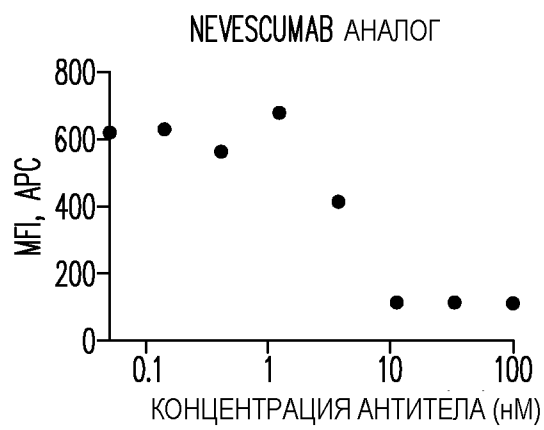
17. Выделенный полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, где аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи содержит любую из SEQ ID NO: 3 - 7, SEQ ID NO: 13 - 17; 15 SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 39; и где аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи содержит любую из SEQ ID NO: 8 - 12, SEQ ID NO: 19 - 26, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40.

**ФИГ. 1А****ФИГ. 1В**

CL_209881	275	K	E	E	Q	I	S	F	R	D	C	A	E	V	F	K	S	G	H	T	T	N	G	I	Y	T	L	T	F	P	N	S	T	E	E	I	K	A	Y	C	D	M	E	A	G	G	G	G	W	T	I
ANGPT2-opt-13	276	K	E	E	Q	I	S	F	R	D	C	A	E	V	F	K	S	G	H	T	T	N	G	I	Y	T	L	T	F	P	N	S	T	E	E	I	K	A	Y	C	D	M	E	A	G	G	G	G	W	T	I
REGN910	277	K	E	E	Q	I	S	F	R	D	C	A	E	V	F	K	S	G	H	T	T	N	G	I	Y	T	L	T	F	P	N	S	T	E	E	I	K	A	Y	C	D	M	E	A	G	G	G	G	W	T	I
MEIN3617	278	K	E	E	Q	I	S	F	R	D	C	A	E	V	F	K	S	G	H	T	T	N	G	I	Y	T	L	T	F	P	N	S	T	E	E	I	K	A	Y	C	D	M	E	A	G	G	G	G	W	T	I
LC06	279	K	E	E	Q	I	S	F	R	D	C	A	E	V	F	K	S	G	H	T	T	N	G	I	Y	T	L	T	F	P	N	S	T	E	E	I	K	A	Y	C	D	M	E	A	G	G	G	G	W	T	I
CL_209881	325	I	Q	R	R	E	D	G	S	V	D	F	Q	R	T	W	K	E	Y	K	V	G	F	G	N	P	S	G	E	Y	W	L	G	N	E	F	V	S	Q	L	T	N	Q	R	Y	V	L	K	I	H	
ANGPT2-opt-13	326	I	Q	R	R	E	D	G	S	V	D	F	Q	R	T	W	K	E	Y	K	V	G	F	G	N	P	S	G	E	Y	W	L	G	N	E	F	V	S	Q	L	T	N	Q	R	Y	V	L	K	I	H	
REGN910	327	I	Q	R	R	E	D	G	S	V	D	F	Q	R	T	W	K	E	Y	K	V	G	F	G	N	P	S	G	E	Y	W	L	G	N	E	F	V	S	Q	L	T	N	Q	R	Y	V	L	K	I	H	
MEIN3617	328	I	Q	R	R	E	D	G	S	V	D	F	Q	R	T	W	K	E	Y	K	V	G	F	G	N	P	S	G	E	Y	W	L	G	N	E	F	V	S	Q	L	T	N	Q	R	Y	V	L	K	I	H	
LC06	329	I	Q	R	R	E	D	G	S	V	D	F	Q	R	T	W	K	E	Y	K	V	G	F	G	N	P	S	G	E	Y	W	L	G	N	E	F	V	S	Q	L	T	N	Q	R	Y	V	L	K	I	H	
CL_209881	375	L	K	D	W	E	G	N	E	A	Y	S	L	Y	E	H	F	Y	L	S	S	E	E	L	N	Y	R	I	H	L	K	G	L	T	G	T	A	G	K	I	S	S	I	S	Q	P	G	N	D	F	S
ANGPT2-opt-13	376	L	K	D	W	E	G	N	E	A	Y	S	L	Y	E	H	F	Y	L	S	S	E	E	L	N	Y	R	I	H	L	K	G	L	T	G	T	A	G	K	I	S	S	I	S	Q	P	G	N	D	F	S
REGN910	377	L	K	D	W	E	G	N	E	A	Y	S	L	Y	E	H	F	Y	L	S	S	E	E	L	N	Y	R	I	H	L	K	G	L	T	G	T	A	G	K	I	S	S	I	S	Q	P	G	N	D	F	S
MEIN3617	378	L	K	D	W	E	G	N	E	A	Y	S	L	Y	E	H	F	Y	L	S	S	E	E	L	N	Y	R	I	H	L	K	G	L	T	G	T	A	G	K	I	S	S	I	S	Q	P	G	N	D	F	S
LC06	379	L	K	D	W	E	G	N	E	A	Y	S	L	Y	E	H	F	Y	L	S	S	E	E	L	N	Y	R	I	H	L	K	G	L	T	G	T	A	G	K	I	S	S	I	S	Q	P	G	N	D	F	S
CL_209881	425	T	K	D	G	D	N	D	K	C	I	C	K	C	S	Q	M	L	T	G	G	W	W	F	D	A	C	G	P	S	N	L	N	G	M	Y	Y	P	Q	R	Q	N	T	N	K	F	N	G	I	K	W
ANGPT2-opt-13	426	T	K	D	G	D	N	D	K	C	I	C	K	C	S	Q	M	L	T	G	G	W	W	F	D	A	C	G	P	S	N	L	N	G	M	Y	Y	P	Q	R	Q	N	T	N	K	F	N	G	I	K	W
REGN910	427	T	K	D	G	D	N	D	K	C	I	C	K	C	S	Q	M	L	T	G	G	W	W	F	D	A	C	G	P	S	N	L	N	G	M	Y	Y	P	Q	R	Q	N	T	N	K	F	N	G	I	K	W
MEIN3617	428	T	K	D	G	D	N	D	K	C	I	C	K	C	S	Q	M	L	T	G	G	W	W	F	D	A	C	G	P	S	N	L	N	G	M	Y	Y	P	Q	R	Q	N	T	N	K	F	N	G	I	K	W
LC06	429	T	K	D	G	D	N	D	K	C	I	C	K	C	S	Q	M	L	T	G	G	W	W	F	D	A	C	G	P	S	N	L	N	G	M	Y	Y	P	Q	R	Q	N	T	N	K	F	N	G	I	K	W
CL_209881	475	Y	Y	W	K	G	S	G	Y	S	L	K	A	T	T	M	M	I	R	P	A	D	F																												
ANGPT2-opt-13	476	Y	Y	W	K	G	S	G	Y	S	L	K	A	T	T	M	M	I	R	P	A	D	F																												
REGN910	477	Y	Y	W	K	G	S	G	Y	S	L	K	A	T	T	M	M	I	R	P	A	D	F																												
MEIN3617	478	Y	Y	W	K	G	S	G	Y	S	L	K	A	T	T	M	M	I	R	P	A	D	F																												
LC06	479	Y	Y	W	K	G	S	G	Y	S	L	K	A	T	T	M	M	I	R	P	A	D	F																												

ФИГ. 2

**ФИГ. 3А****ФИГ. 3В****ФИГ. 3С****ФИГ. 3D**

**ФИГ. 3Е****ФИГ. 3F****ФИГ. 3G**