

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043390**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.22

(21) Номер заявки
201992630

(22) Дата подачи заявки
2018.05.04

(51) Int. Cl. *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ АНТАГОНИСТАМИ APLNR И ИНГИБИТОРАМИ VEGF

(31) 62/502,621

(32) 2017.05.06

(33) US

(43) 2020.04.29

(86) PCT/US2018/031255

(87) WO 2018/208625 2018.11.15

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

(72) Изобретатель:
**Цао Цзинтай, Чеунг Юнис, Лобов
Иван Б. (US)**

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

(56) US-A1-2015252107

US-A1-2016144025

ELEFThERiADOU MARIA ET AL.: "Long-Term Outcomes of Aflibercept Treatment for Neovascular Age-Related Macular Degeneration in a Clinical Setting", AMERICAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 174, 14 October 2016 (2016-10-14), p. 160-168, XP029890555, ISSN: 0002-9394, DOI: 10.1016/J.AJO.2016.09.038, the whole document

GREENWOOD JOHN ET AL.: "Apelin Is Required For Non-sprouting Vascular Remodelling In The Developing And Pathogenic Retina", ARVO ANNUAL MEETING ABSTRACT SEARCH AND PROGRAM PLANNER, vol. 2011, 1 May 2011 (2011-05-01), p. 4823, XP009507405, the whole document

SAKIMOTO SUSUMU ET AL.: "A role for endothelial cells in promoting the maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice", DEVELOPMENT, THE COMPANY OF BIOLOGISTS LTD, GB, vol. 139, № 7, 1 April 2012 (2012-04-01), p. 1327-1335, XP009507404, ISSN: 0950-1991, DOI: 10.1242/DEV.072330, the whole document

(57) Изобретение предоставляет способы лечения, профилактики или снижения тяжести заболевания глаз. Способы по изобретению включают в себя введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей антагонист APLNR, такой как анти-APLNR антитело, в сочетании с антагонистом фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (например, афлиберцепта).

B1**043390****043390****B1**

Перечень последовательностей

Данная заявка включает в себя в качестве ссылки перечень последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10354WO01-Sequence.txt, созданного 4 мая 2018 г. и содержащего 16843 байта.

Область техники

Данное изобретение относится к способам лечения сосудистого заболевания глаз, в частности, путем введения антагониста рецептора апелина и антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) субъекту, нуждающемуся в этом.

Уровень техники

Сосудистые заболевания глаз являются основной причиной потери зрения у современного стареющего населения. Эти заболевания могут характеризоваться аномальными "протекающими" кровеносными сосудами, врастающими в сетчатку. Двумя крупнейшими виновниками в этой популяции субъектов являются диабетическая ретинопатия и экссудативная возрастная макулярная дегенерация.

Диабетическая ретинопатия (DR) является основной причиной нарушения зрения в Соединенных Штатах (Klein et al., 1984, *Ophthalmology*, 91: 1464-1474; Moss et al., 1998, *Ophthalmology*, 105: 998-1003). Диабетическая ретинопатия возникает в результате микрососудистой декомпенсации, начинающейся с утолщения базальной мембраны (Ruggiero et al., 1997, *Diabetes Metab.*, 23: 30-42), что в конечном итоге приводит к окклюзии сосудов и неоваскуляризации (Porta et al., 2002, *Diabetologia*, 45: 1617-1634). По оценкам около 28% пациентов в возрасте 40 лет и старше страдают от DR, а 4,4% имеют DR, угрожающую зрению (Zhang et al., 2010, *JAMA*, 304: 649-656). Диабетический макулярный отек (DME) является проявлением DR и является наиболее частой причиной слепоты у людей молодого и среднего возраста (Klein et al., 1984, *Ophthalmology*, 91: 1464-1474; Moss et al., 1998, *Ophthalmology*, 105: 998-1003).

Возрастная макулярная дегенерация (AMD) является основной причиной серьезной потери зрения у людей в возрасте 50 лет и старше в развитых странах. В последние годы были достигнуты значительные успехи в лечении AMD благодаря введению анти-ангиогенных агентов, что дает надежду на значительное восстановление зрения у пациентов с неоваскулярной AMD (Keane et al., 2012, *Surv. Ophthalmol.*, 57: 389-414).

Препроапелин представляет собой белок из 77 аминокислот, экспрессируемый в ЦНС и периферических тканях человека, например легких, сердце и молочной железе. Было показано, что пептиды, содержащие С-концевые фрагменты пептида апелина различного размера, активируют рецептор, связанный с G-белком, рецептор APJ (теперь известный как APLNR) (Habata, et al., 1999, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1452: 25-35; Hosoya et al., 2000, *JBC*, 275 (28): 21061-67; Lee et al., 2000, *J. Neurochem.*, 74: 34-41; Medhurst et al., 2003, *J. Neurochem.*, 84: 1162-1172). Многие исследования указывают на то, что пептиды и аналоги апелина переносят сердечно-сосудистые и ангиогенные действия через их взаимодействие с рецептором APJ (APLNR), такие как эндотелийзависимая вазодилатация (Tatemoto et al., 2001, *Regul. Pept.*, 99: 87-92).

Система апелинов, по-видимому, играет роль в патофизиологическом ангиогенезе. Исследования показали, что апелин может быть вовлечен в гипоксия-индуцированный ангиогенез сетчатки (Kasai et al., 2010, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 30: 2182-2187). В некоторых сообщениях некоторые композиции могут ингибировать ангиогенез путем ингибирования пути апелин/APJ (см., например, патент США № 7736646), такие как ингибиторы APLNR, способные блокировать патологический ангиогенез и, следовательно, пригодные для ингибирования васкуляризации в сетчатке (Kojima, Y., Quertermous, T., 2008, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 28: 1687-1688). Таким образом, вмешательство в сигналинг, опосредованный апелином, также может быть полезным для ранней профилактики пролиферативной диабетической ретинопатии (Tao et al., 2010, *Invest. Ophthalmol. Visual. Science*, 51: 4237-4242; Du, J.H. et al., *Int. J. Ophthalmol.*, 2014 Dec 18, 7 (6): 968-73; Lu, Q. et al., 2013, *PLoS One*, 8 (7): e69703). Недавно апелин был вовлечен в механизм ретинопатии недоношенных (AH YF et al., *Clin Ophthalmol.*, 2017 Feb 21, 11: 387-392).

Антисосудистая терапия эндотелиальным фактором роста (VEGF) (например, афлиберцептом) является стандартом лечения неоваскулярных AMD и DME. Эффективность и безопасность афлиберцепта в этих популяциях субъектов хорошо изучена (Dixon et al., 2009, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 18: 1573-80). Тем не менее при AMD, хотя приблизительно 95% субъектов сохраняли свое зрение, только приблизительно 30% субъектов достигли улучшения на 15 или более букв с наибольшей остротой зрения с коррекцией (BCVA) за 1 г. В DME также существует возможность улучшения исходов лечения. Как видно, с афлиберцептом и ранибизумабом менее чем у 50% пациентов с потерей зрения из-за DME достигается улучшение на 15 или более букв в течение 1 и 2 лет. Кроме того, в исследованиях с ранибизумабом клинические признаки пролиферативной ретинопатии развивались у 7,2% субъектов, получавших 3 г. ежемесячное лечение ранибизумабом, причем до 3,2% пациентов, нуждающихся в панретинальной фотокоагуляции, потенциально визуально инвалидирующем методе лечения (Brown et al., 2013, *Ophthalmology*, 10: 2013-22).

Хотя известно, что и апелин/APLNR, и VEGF вносят вклад в ангиогенез и развитие сосудов, механизм, с помощью которого два сигнальных пути взаимодействуют в стимуляции ангиогенеза, остается неясным. В частности, известно, что эти пути участвуют в формировании сосудов сетчатки, и различные

исследования сообщают, что апелин и VEGF имеют положительные и отрицательные эффекты обратной связи, в которых повышенная экспрессия одного может способствовать экспрессии другого, или антагонизм одного подавляет экспрессию другого (Lu et al., 2014, Molecular Vision, 20: 1122-1131).

Интравитреальные (IVT) доставки анти-VEGF терапий, таких как ранибизумаб и афлиберцепт, продемонстрировали эффективность и безопасность при хориоретинальных заболеваниях. Тем не менее существует множество дополнительных факторов, которые способствуют проницаемости сосудов, неоваскуляризации и других сосудистых дисфункций.

Краткое описание сущности изобретения

В одном аспекте данное изобретение относится к способам лечения, предотвращения или ослабления по меньшей мере одного симптома или признака сосудистого заболевания глаз или расстройства у субъекта. Способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист APLNR вводят в комбинации с антагонистом фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), например, путем введения терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антагонист VEGF.

В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или расстройство глаз выбрано из группы, состоящей из диабетической ретинопатии, диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскуляризации сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, окклюзии разветвленной вены сетчатки, полипной хориоидальной васкулопатии, хориоидальной неоваскуляризации (CNV), дегенеративной миопии (миопическая CNV), неоваскулярной глаукомы и ретинопатии недоношенных.

В другом аспекте данное изобретение относится к способам ингибирования ангиогенеза сетчатки у субъекта. Способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR в комбинации с антагонистом VEGF, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления изобретения ангиогенез сетчатки связан с сосудистым заболеванием глаз или расстройством.

В другом аспекте данное изобретение относится к способам ингибирования неоваскуляризации сетчатки (например, у субъекта с заболеванием глаз или расстройством, связанным с ангиогенезом). Способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR в комбинации с антагонистом VEGF, субъекту, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте данное изобретение относится к способам ингибирования хориоидальной неоваскуляризации у субъекта. Способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR в комбинации с антагонистом VEGF, субъекту, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте данное изобретение относится к способам улучшения отрастания сосудов и уменьшения патологической неоваскуляризации у субъекта. Способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR в комбинации с антагонистом VEGF, субъекту, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте данное изобретение предлагает способы стимулирования ревазуляризации сетчатки у субъекта, нуждающегося в этом. Способы включают введение терапевтически эффективного количества антагониста APLNR субъекту, нуждающемуся в этом; и введение субъекту терапевтически эффективного количества антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

В другом аспекте данное изобретение предлагает способы стимулирования равномерного отрастания сосудов сетчатки у субъекта, нуждающегося в этом. Способы включают введение терапевтически эффективного количества антагониста APLNR субъекту, нуждающемуся в этом; и введение субъекту терапевтически эффективного количества антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

В другом аспекте данное изобретение предлагает способы улучшения отрастания сосудов в сетчатке субъекта, нуждающегося в этом. Способы включают введение терапевтически эффективного количества антагониста APLNR субъекту, нуждающемуся в этом; и введение субъекту терапевтически эффективного количества антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

В другом аспекте данное изобретение предлагает способы стимулирования равномерного роста кровеносных сосудов в сетчатке у субъекта, нуждающегося в этом. Способы включают введение терапевтически эффективного количества антагониста APLNR субъекту, нуждающемуся в этом; и введение субъекту терапевтически эффективного количества антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

В другом аспекте данное изобретение предлагает способы улучшения организации кровеносных сосудов сетчатки у субъекта, нуждающегося в этом. Способы включают введение терапевтически эффективного количества антагониста APLNR субъекту, нуждающемуся в этом; и введение субъекту терапевтически эффективного количества антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

В любом из способов, обсуждаемых выше или в данном документе, субъектом может быть индивидуум, у которого диагностировано заболевание или расстройство глаз. В некоторых случаях заболевание или расстройство глаз выбрано из группы, состоящей из диабетической ретинопатии, пролиферативной

диабетической ретинопатии, диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскуляризации сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, окклюзии разветвленной вены сетчатки, полипозной хориоидальной васкулопатии, хориоидальной неоваскуляризации (CNV), дегенеративной миопии (миопическая CNV), неоваскулярной глаукомы и ретинопатии недоношенных. В некоторых случаях заболевание или расстройство глаз представляет собой возрастную макулярную дегенерацию. В некоторых случаях заболевание или расстройство глаз представляет собой диабетический макулярный отек. В некоторых случаях заболевание или расстройство глаз представляет собой ретинопатию недоношенных. В некоторых случаях заболевание или расстройство глаз представляет собой пролиферативную диабетическую ретинопатию.

Иллюстративные антагонисты APLNR, которые могут использоваться в контексте способов или композиций по данному изобретению, включают небольшие молекулы химических ингибиторов APLNR, или биологические агенты, которые нацелены на APLNR, такие как пептиды, пептидные миметики и антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист APLNR блокирует взаимодействие APLNR и апилина.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, антагонист APLNR представляет собой антитело или антигенсвязывающий белок, который связывает антагонист APLNR и ингибирует сигналинг APLNR. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающий белок содержит определяющие комплементарность участки (HCDR) тяжелой цепи переменного участка тяжелой цепи (HCVR), содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 13, и CDR легкой цепи переменного участка легкой цепи (LCVR), содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 18. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-APLNR антитело или его антиген-связывающий белок содержит определяющие комплементарность участки (CDR) переменного участка тяжелой цепи (HCVR) анти-антитела APLNR, выбранного из группы, состоящий из H2aM9232N (или H4H9232N) и H1M9207N.

В любом из способов или композиций, обсуждаемых выше или в данном документе, антагонист APLNR может содержать анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с APLNR человека. В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют за связывание с рецептором апилина человека (APLNR) с эталонным антителом, содержащим пару последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/7 и 13/18, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с APLNR человека. В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на APLNR, что и эталонное антитело, содержащее пару последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/7 и 13/18, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с APLNR человека. В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(a) определяющие комплементарность участки (CDR) переменного участка тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 13; и

(b) CDR переменного участка легкой цепи (LCVR), имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 18.

В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 3-4-5-8-9-10 и 14-15-16-19-20-21. В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) переменный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 13; и

(b) переменный участок легкой цепи (LCVR), имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 18.

В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR тяжелой и легкой цепи пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/7 и 13/18. В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/7 и 13/18.

В одном варианте осуществления изобретения любой из способов или композиций, обсуждаемых выше или в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2/7.

В одном варианте осуществления изобретения любой из способов или композиций, обсуждаемых выше или в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 13/18.

В любом из способов или композиций, обсуждаемых выше или в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой антитело человека с константным участком тяжелой цепи IgG1 или IgG4. В одном варианте осуществления изобретения константный участок тяжелой цепи представляет собой человеческий IgG1. В одном варианте осуществления изобретения

константный участок тяжелой цепи представляет собой человеческий IgG4.

В различных вариантах осуществления изобретения, любой из способов или композиций, обсуждаемых выше или в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует взаимодействие APLNR и апелина. В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует взаимодействие APLNR и апелина, проявляя по меньшей мере 50% ингибирование связывания в анализе конкурентного связывания. В других вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не блокирует или только частично блокирует взаимодействие APLNR и апелина.

Антагонисты VEGF, которые можно использовать в комбинации с антагонистом APLNR в композициях и способах по данному изобретению, включают анти-VEGF антитела (например, ранибизумаб), низкомолекулярные ингибиторы VEGF (например, сунитиниб) и VEGF-ингибирующие слитые белки ("VEGF Traps"). Примером антагониста VEGF, который можно использовать в комбинации с антагонистом APLNR в способах лечения по данному изобретению, является афлиберцепт, VEGF-ингибирующий слитый белок (см., например, US 7087411).

В любом одном из способов или композиций, описанных выше или в данном документе, антагонист VEGF содержит химерную молекулу VEGF на основе рецептора (VEGF ловушки). В некоторых случаях ловушка VEGF содержит один или более иммуноглобулин (Ig)-подобных доменов VEGFR1, один или более Ig-подобных доменов VEGFR2 и мультимеризирующий домен. В некоторых случаях VEGF ловушка содержит Ig-подобный домен 2 VEGFR1, Ig-подобный домен 3 VEGFR2 и мультимеризирующий домен. В некоторых случаях VEGF ловушка представляет собой афлиберцепт или его биоподобную молекулу. В некоторых случаях антагонист VEGF состоит из димера двух полипептидов, состоящих из аминокислот 27-457 SEQ ID NO: 23.

В другом аспекте данное описание относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антагониста APLNR и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В определенных вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция дополнительно содержит антагонист VEGF.

В различных вариантах осуществления изобретения, данное описание относится к использованию антагониста APLNR в сочетании с антагонистом VEGF при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания глаз или расстройства у субъекта, включая людей, или для достижения других целей любого из способов, обсужденных выше или в данном документе. Все способы, обсуждаемые выше или в данном документе, могут быть осуществлены в виде применения или применений антагонистов APLNR и антагонистов VEGF для лечения заболеваний глаз или расстройств, или других целей перечисленных способов. Другие варианты осуществления изобретения включают антагонисты APLNR и антагонисты VEGF для использования в способах, обсуждаемых выше или в данном документе.

В другом аспекте данное изобретение относится к композиции для лечения сосудистого заболевания глаз или расстройства, в котором композиция содержит терапевтически эффективное количество антагониста APLNR, терапевтически эффективное количество антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и подходящий носитель, эксципиент или разбавитель. В различных вариантах осуществления изобретения композиции, антагонист APLNR или антагонист VEGF могут быть такими, как обсуждено выше или в данном документе.

Другие варианты осуществления изобретения будут очевидны из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А и 1В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчатки мыши, обработанной системно (в/б) в P2 до P5, и график рассчитанной сосудистой площади. Остаточная сосудистая площадь была значительно меньше в сетчатках, обработанных α АпелинР (анти-APLNR антитело H2aM9232N) (23% при 25 мг/кг, $p < 0,05$), по сравнению с необработанными сетчатками. Эндотелиальные клетки сетчатки были окрашены GS Lectin I. Изображения были получены при 20 $\times$ (для количественного определения) и 40 $\times$. Статистический анализ проводился с использованием критерия Стьюдента. Избирательное ингибирование АпелинР через системную инъекцию замедляло нормальное разрастание сосудов в развивающейся сетчатке у детенышей в P5. При дозе 25 мг/кг блокирование АпелинР слегка ингибирует разрастание сосудов.

Фиг. 2А и 2В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчатки мыши, обработанной системно (в/б) в P2 до P5, и график рассчитанной сосудистой площади. Остаточная сосудистая область была значительно меньше у обработанных α АпелинР (35% при 50 мг/кг, $p < 0,005$) сетчаток по сравнению с необработанными сетчатками. Эндотелиальные клетки сетчатки были окрашены GS Lectin I. Изображения были получены при 20 $\times$ (для количественного определения) и 40 $\times$. Статистический анализ проводился с использованием критерия Стьюдента. Избирательное ингибирование АпелинР через системную инъекцию замедляло нормальное разрастание сосудов в развивающейся сетчатке у детенышей в P5. Увеличивая дозу до 50 мг/кг, нацеливание на АпелинР дополнительно задерживает разрастание сосудов сетчатки.

Фиг. 3А и 3В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчатки мыши, обработанной системно (в/б) в P2 до P5, и график рассчитанной сосудистой площади. В этом слепом исследовании, 50 мг/кг α АпелинР снижали рост сосудов на 29,8% ($p < 0,0001$) по сравнению с обработанными Fc контролями. Эндотелиальные клетки сетчатки были окрашены GS Lectin I. Изображения были получены при 20 $\times$ (для количественного определения) и 40 $\times$. Статистический анализ проводился с использованием критерия Стьюдента. Избирательное ингибирование АпелинР через системную инъекцию замедляет нормальное разрастание сосудов в развивающейся сетчатке у детенышей P5.

Фиг. 4А и 4В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчатки мыши, обработанной системно (в/б) в P2 до P5, и график рассчитанной сосудистой площади. Остаточная площадь сосудов была значительно меньше в комбинации (α АпелинР+афлиберцепт) (62% при 50 мг/кг, $p < 0,0001$) по сравнению с отдельными реагентами, только α АпелинР (31% при 50 мг/кг, $p < 0,001$) или афлиберцептом (43% при 50 мг/кг, $p < 0,005$). Эндотелиальные клетки сетчатки окрашивали GS Lectin I. Обратите внимание на влияние на дозу и относительную площадь васкуляризации. Изображения были сделаны при 20 $\times$ (для количественного определения) и 40 $\times$. Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки. Как при системном, так и при интравитреальном введении (см. фиг. 5А и 5В) введение α АпелинР и афлиберцепта привело к регрессии нормально развивающейся сосудистой сети сетчатки. Блокирование как АпелинР, так и VEGFA с помощью системной инъекции более эффективно для предотвращения роста сосудов по сравнению с блокированием только АпелинР или VEGFA. В этой модели комбинированное лечение дополнительно уменьшало сосудистую площадь на 46% ($p < 0,0005$) по сравнению с α АпелинР и на 32% ($p < 0,001$) по сравнению с афлиберцептом.

Фиг. 5А и 5В представляют репрезентативные микрофотографии сетчатки мыши, обработанной посредством интравитреальной (IVT) инъекции в P4-P6, и график рассчитанной сосудистой площади. Остаточная площадь сосудов была значительно меньше в комбинации (α АпелинР+афлиберцепт) (68% при 5 мкг/кг, $p < 0,0001$) по сравнению с отдельными реагентами, только α АпелинР (43% при 5 мкг/кг, $p < 0,0001$) или афлиберцептом (65% при 5 мкг/кг, $p < 0,0001$). Эндотелиальные клетки сетчатки окрашивали GS Lectin I. Обратите внимание на влияние на дозу и относительную площадь васкуляризации. Изображения были сделаны при 20 $\times$ (для количественного определения) и 40 $\times$. Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки. Как при системном, так и при интравитреальном введении введение α АпелинР и афлиберцепта приводит к регрессии нормально развивающейся сосудистой сети сетчатки. Блокирование как АпелинР, так и VEGFA с помощью интравитреальной инъекции еще более эффективно для предотвращения роста сосудов по сравнению с блокированием только АпелинР и VEGFA. IVT комбинированное лечение дополнительно уменьшало сосудистую площадь на 50% ($p < 0,0005$) по сравнению с α АпелинР и на 34% ($p < 0,001$) по сравнению с афлиберцептом.

Фиг. 6А и 6В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчаток глаза мыши OIR, обработанных системно (в/б) в P12 до P16, и графики рассчитанной аваскулярной площади. Остаточная аваскулярная площадь была значительно меньше в сетчатке α АпелинР (29%, $p < 0,05$) и афлиберцепта (27,5%, $p < 0,01$) по сравнению с сетчаткой Fc (контроль). Обратите внимание на значительное уменьшение неоваскулярных пучков в образцах, обработанных α АпелинР (67%, $p < 0,0001$) и афлиберцептом (94%, $p < 0,0005$), по сравнению с Fc. Эндотелиальные клетки сетчатки были окрашены GS Lectin I. Изображения были получены при 20 $\times$ (количественное определение аваскулярной площади) и 40 $\times$ (количественное определение аномальной неоваскулярной площади). Статистический анализ проводился с использованием критерия Стьюдента. Ингибирование АпелинР и VEGFA с помощью системной инъекции способствует отращанию сосудов сетчатки и уменьшает патологическую неоваскуляризацию.

На фиг. 7А и 7В представлены репрезентативные микрофотографии сетчатки глаза мыши с индуцированной ретинопатией (OIR), обработанной интравитреально в P12 до P16, и графики рассчитанной аваскулярной площади. Остаточная аваскулярная площадь была значительно уменьшена в условиях α АпелинР (27,5% $p < 0,05$) и увеличена в условиях афлиберцепта (32%, $p < 0,0001$) по сравнению с Fc контролями. Обратите внимание на значительное уменьшение неоваскулярных пучков в α АпелинР (60%, $p < 0,0001$) и полное исчезновение пучков в образцах афлиберцепта. Эндотелиальные клетки сетчатки окрашивали GS Lectin I. Обратите внимание на влияние на дозу и относительную площадь васкуляризации. Изображения были сделаны при 20 $\times$ (количественное определение аваскулярной площади) и 40 $\times$ (количественное определение аномальной неоваскулярной площади). Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки. Как при системном (см. фиг. 6А и 6В), так и при интравитреальном введении селективное ингибирование АпелинР способствует отращанию сосудов сетчатки и уменьшает неоваскуляризацию у мышей OIR. Ингибирование АпелинР посредством интравитреальной инъекции улучшает отращание сосудов и уменьшает аномальные неоваскуляризации, тогда как ингибирование VEGFA останавливает отращание сосудов и полностью останавливает любые неоваскуляризации.

Фиг. 8А и 8В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчаток глаза мыши OIR,

обработанных системно (20×) в P12 до P16, и графики рассчитанной аваскулярной площади. Скорость отрастания при комбинированном лечении аналогична для каждого агента отдельно, отрастание сосудов улучшено по сравнению с контрольными сетчатками, обработанными hFc, и между группами лечения произошли значительные изменения в аваскулярной площади ($p < 0,0005$).

Фиг. 9А и 9В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчаток глаза мыши OIR, обработанных системно (40×) в P12 до P16, и графики рассчитанной аномальной сосудистой площади. Комбинированное лечение показывает меньшее количество обрезанных сосудов по сравнению с афлиберцептом и меньшее количество аномальных неоваскуляризации по сравнению с анти-APLNR и Fc контролем (фиг. 9А). Фиг. 9В демонстрирует, что были значительные изменения в аномальной сосудистой площади между группами лечения ($p < 0,0005$). Аномальная сосудистая площадь была значительно уменьшена с анти-APLNR (***, $p < 0,0005$), с афлиберцептом (***, $p < 0,005$) и с комбинацией (***, $p < 0,0005$) по сравнению с контролем Fc, и аномальная сосудистая площадь была также значительно уменьшена в группе комбинированного лечения (*, $p < 0,05$) по сравнению с группой лечения анти-APLNR.

На фиг. 10 представлены образцы обработки и измерения изображения, используемые для расчета площади сосуда и длины сосуда в примере 7. "Исходные изображения" - это 40× микрофотографии, показанные на фиг. 9А.

Фиг. 11А и 11В представляют репрезентативные обработанные изображения, показывающие организацию и однородность сосудов с микрофотографий (40×) сетчаток глаза мыши OIR, обработанных системно в P12 до P16, и графики рассчитанной площади сосуда. Как продемонстрировано на фиг. 11А, комбинация анти-APLNR антитела и афлиберцепта приводила к образованию сосудов сетчатки, которые более организованы и однородны по сравнению только с анти-APLNR, и менее разреженными (с меньшим количеством обрезанных сосудов) по сравнению только с афлиберцептом. Фиг. 11В демонстрирует, что были значительные изменения в площади сосудов между группами лечения ($p < 0,0005$). Площадь сосудов была значительно увеличена с анти-APLNR (***, $p < 0,0005$) и уменьшена с афлиберцептом (***, $p < 0,005$) и комбинированной терапией (*, $p < 0,05$) по сравнению с Fc контролем. Площадь сосудов была значительно уменьшена с афлиберцептом (####, $p < 0,0005$) и с комбинацией (####, $p < 0,0005$) по сравнению с анти-APLNR. В отличие от этого, площадь сосудов была значительно увеличена при комбинированной терапии (&&&, $p < 0,005$) по сравнению с афлиберцептом.

Фиг. 12А и 12В представляют репрезентативные обработанные изображения, показывающие плотность сосудов с микрофотографий (40×) сетчаток глаза мыши OIR, обработанных системно в P12 до P16, и графики рассчитанной длины сосуда. Как показано на фиг. 12А, комбинация анти-APLNR антитела и афлиберцепта продуцировала сосуды сетчатки промежуточной плотности по сравнению с анти-APLNR (более высокой плотностью) или только с афлиберцептом (меньшей плотностью). Фиг. 12В демонстрирует, что были значительные изменения в длине сосуда между группами лечения ($p < 0,0005$). Длина сосудов была значительно уменьшена с афлиберцептом (####, $p < 0,0005$) и с комбинацией (####, $p < 0,0005$) по сравнению с анти-APLNR. В отличие от этого, длина сосудов была значительно увеличена при комбинированной терапии (&&&, $p < 0,005$) по сравнению с афлиберцептом.

Подробное описание изобретения

Перед описанием данного описания следует понимать, что данное описание не ограничивается определенными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена исключительно для описания определенных вариантов осуществления и ее не следует рассматривать как ограничивающую, поскольку объем данного описания будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, что обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой принадлежит данное описание. Используемый в данном документе термин "около" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, как используется в данном документе, выражение "около 100" включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Несмотря на то что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть применены на практике или при испытании данного описания, в данном документе описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в этом описании, полностью включены в данное описание посредством ссылки.

Данное изобретение и его описание частично основаны на неожиданном открытии того, что комбинация антагониста APLNR и антагониста VEGF (например, анти-APLNR антитела и ловушки VEGF) может вызывать более организованную и упорядоченную реваскуляризацию промежуточной плотности (с меньшим количеством обрезанных сосудов) в сетчатке субъекта, чем наблюдается только с антагонистом APLNR или антагонистом VEGF.

Определения.

Выражения "рецептор апелина", "APLNR", "АпелинР", "рецептор APJ," и т.п., как использовано в

данном описании, относятся к белку человека APLNR, имеющего аминокислотную последовательность, представленную как

```
MEEGGDFDNYYGADNQSECEYTDWKSSGALIPAIYMLVFLGTTGNGLVLWTVFRSSR
EKRRSADIFIASLAVADLTFVVTLPWATYTYRDYDWPFGTFFCKLSSYLIFVNMVYASVF
CLTGLSFDRLAIVRPVANARLRLRVSGAVATAVLWVLAALLAMPVMVLRTTGDLENT
TKVQCYMDYSMVATVSSEWAVEVGLGVSSTTVGFVVPFTIMLTCTYFFIAQTIAGHFRK
ERIEGLRKRRRLLSIIVVLVVTALCWMPYHLVKTLYMLGSLHLWPCDFDLFLMNIFPY
CTCISYVNSCLNPFLYAFFDPRFRQACTSMLCCGQSRCAGTSHSSSGEKSASYSSGHSQG
PGPNMGKGGEQMHEKSIPYSQETLVVD (SEQ ID NO: 22),
```

или по существу, аналогична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22. Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в данном документе предназначены для ссылки на человеческую версию соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они принадлежат виду, отличному от человека (например, "мышинный APLNR", "обезьяний APLNR" и т.д.).

Используемый в данном документе термин "антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывает APLNR" или "анти-APLNR антитело" включает молекулы иммуноглобулина, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают фрагмент белка APLNR. Молекулы APLNR включают природные белки APLNR, а также варианты рекомбинантных белков APLNR, такие как, например, мономерные и димерные конструкции APLNR. В вариантах осуществления изобретения, антитело, которое связывает APLNR или его антигенсвязывающий фрагмент, является антагонистом APLNR.

Используемый в данном документе термин "антагонист" относится, отчасти, к части, которая связывается с рецептором в том же сайте или рядом с тем же сайтом, что и агонист (например, эндогенный лиганд), но который не активирует внутриклеточный ответ, обычно инициируемый активной формой рецептора и тем самым ингибирует или нейтрализует внутриклеточный ответ с помощью агониста или частичного агониста. Термин "антагонист" может также отчасти относиться к фрагменту, который связывается с агонистом рецептора, тем самым секвестрируя агонист от взаимодействия с его родственным рецептором. Примером антагониста, который связывает агонист, является ловушка для лиганда, такая как VEGF ловушка. В некоторых случаях антагонисты не уменьшают базовый внутриклеточный ответ в отсутствие агониста или частичного агониста. Антагонист не обязательно должен действовать как ингибитор конкурентного связывания, но может действовать путем секвестрирования агониста или не прямой модуляции последующего эффекта.

Как использовано в данном документе, термин антагонист APLNR может относиться к фрагменту, который связывается с рецептором APLNR в том же сайте или вблизи того же сайта в качестве агониста (например, апелин), но не активирует внутриклеточный ответ, обычно инициируемый активной формой рецептора, и тем самым ингибирует или нейтрализует внутриклеточный ответ APLNR. В вариантах осуществления изобретения, антагонист APLNR представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает APLNR. Примеры антагонистов APLNR можно найти в международной патентной публикации № WO2015077491, опубликованной 28 мая 2015 г., которая специально включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Другие антагонисты APLNR могут включать небольшие молекулы и другие биологические объекты, такие как пептиды.

Термин "иммуноглобулин" (Ig) относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящему из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, которые все четыре могут быть связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов была хорошо охарактеризована. См., например, *Fundamental Immunology*, ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed., Raven Press, N.Y. (1989)).

Термин "антитело", как используется в данном документе, означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR), который специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, APLNR). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM), а также молекулы иммуноглобулина, включая фрагмент одной или более тяжелых цепей или фрагмент одной или более легких цепей (например, фрагменты Fab, F(ab')₂ или scFv), как описано в данном документе. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельный участок тяжелой цепи (сокращенно обозначенный в данном документе как HCVR или V_H) и константный участок тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи включает три домена, C_H1, C_H2 и C_H3. Каждая легкая цепь содержит вариабельный участок легкой цепи (сокращенно обозначенный в данном документе как LCVR или V_L) и константный участок легкой цепи. Константный участок легкой цепи содержит один домен (C_L1). Участки V_H и V_L могут быть далее подразделены на участки гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность участками (CDR), которые чередуются с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления данного изо-

бретения, FR анти-APLNR антитела (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть природно или искусственно модифицированы. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

Используемый в данном документе термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины "антигенсвязывающий участок" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в данном документе, включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут происходить, например, из полноразмерных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генетической инженерии, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антител. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, библиотеки фаговых антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с применением методик молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д. Такие методы также могут быть использованы для синтеза любой молекулы слияния антител, содержащей антигенсвязывающий фрагмент, полученный из полной молекулы антитела.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя

- (i) фрагменты Fab;
- (ii) фрагменты F(ab')₂;
- (iii) фрагменты Fd;
- (iv) фрагменты Fv;
- (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv);
- (vi) фрагменты дАТ; и
- (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гиперварибельный участок антитела (например, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), такую как пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4.

Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемый в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела в типичном случае содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом или в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих V_H-домен, ассоциированный с V_L-доменом, V_H- и V_L-домены могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменный участок может быть димерным и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. В альтернативном варианте антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H- или V_L-домен.

В определенных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по данному изобретению, включают

- (i) V_H-C_H1;
- (ii) V_H-C_H2;
- (iii) V_H-C_H3;
- (iv) V_H-C_H1-C_H2;
- (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3;
- (vi) V_H-C_H2-C_H3;
- (vii) V_H-C_L;
- (viii) V_L-C_H1;
- (ix) V_L-C_H2;
- (x) V_L-C_H3;
- (xi) V_L-C_H1-C_H2;
- (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3;

(xiii) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$; и

(xiv) V_L-C_L .

В любой конфигурации переменных и постоянных доменов, в том числе любой из иллюстративных конфигураций, приведенных выше, переменные и постоянные домены могут быть непосредственно связаны друг с другом или могут быть связаны с помощью полноразмерного или частичного шарнирного или линкерного участка. Шарнирный участок может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или постоянными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по данному описанию может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и постоянных доменов, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерными V_H - или V_L -доменами (например, с помощью дисульфидной(дисульфидных) связи(связей)).

Как и в случае с полноразмерными молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет в типичном случае содержать по меньшей мере два различных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же самом антигене. Любой формат мультиспецифических антител, в том числе форматы иллюстративных биспецифических антител, описанных в данном документе, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по данному описанию с использованием стандартных методик, доступных в данной области техники.

Фраза "антитело-слитые белки" включает рекомбинантные полипептиды и белки, полученные из антител по изобретению, которые были сконструированы так, чтобы содержать антитело или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе. Пептидный компонент может быть слит с анти-APLN_R антителом или антигенсвязывающим фрагментом либо на N-конце, либо на C-конце легкой или тяжелой цепи антитела, с пептидными линкерами или без них. Фраза "слитый с", как используется в данном документе, означает (но не ограничивается этим) полипептид, образованный путем экспрессии химерного гена, полученного путем объединения более чем одной последовательности, обычно путем клонирования одного гена в вектор экспрессии в рамке со вторым геном так, что два гена кодируют один непрерывный полипептид. Методы рекомбинантного клонирования, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и клонирование рестрикционной эндонуклеазой, хорошо известны в данной области. В дополнение к получению с помощью рекомбинантной технологии, части полипептида могут быть "слиты" друг с другом посредством химической реакции или других способов, известных в данной области для получения нестандартных полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения компоненты или аминокислоты слитого с антителом белка разделяются линкерным (или "спейсерным") пептидом. Такие пептидные линкеры хорошо известны в данной области (например, линкеры с полиглицином или Gly-Ser) и, как правило, позволяют правильно сворачивать один или оба компонента слитого с антителом белка. Линкер обеспечивает гибкий участок соединения компонента слитого белка, позволяя двум концам молекулы двигаться независимо, и может играть важную роль в сохранении соответствующих функций каждой из двух групп. Следовательно, участок соединения действует в некоторых случаях и как линкер, который объединяет две части вместе, и как спейсер, который позволяет каждой из двух частей формировать свою собственную биологическую структуру и не мешать другой части. Кроме того, участок соединения должен создавать эпитоп, который не будет распознаваться иммунной системой субъекта как чужеродный, другими словами, не будет считаться иммуногенным. Выбор линкера также может влиять на активность связывания и, следовательно, на биологическую активность слитого белка (см. Huston et al., 1988, PNAS, 85: 16: 5879-83; Robinson & Bates, 1998, PNAS, 95 (11): 5929-34; и Arai et al., 2001, PEDS, 14 (8): 529-32; Chen, X. et al., 2013, Advanced Drug Delivery Reviews, 65: 1357-1369.). В одном варианте осуществления изобретения пептид апелина связан с C-концом или с N-концом легкой цепи или тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через один или более пептидных линкеров.

Антитела по данному изобретению могут функционировать через комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ). "Комплементзависимая цитотоксичность" (CDC) относится к лизису антиген-экспрессирующих клеток с помощью антитела по изобретению в присутствии комплемента. "Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" (АЗКЦ) относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, клетки натуральных киллеров (НК), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанные антитела на клетке-мишени и тем самым приводят к лизису клетки-мишени. CDC и АЗКЦ могут быть измерены с использованием анализов, которые хорошо известны и доступны в данной области (см., например, патенты США № 5500362; и 5821337; и Clynes et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 95: 652-656). Постоянный участок антитела важен для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточнозависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, жела-

тельно ли для антитела опосредовать цитотоксичность.

В другом аспекте антитело может быть сконструировано в его Fc-домене для активации всех, некоторых или ни одной из нормальных эффекторных функций Fc, не влияя на желаемые фармакокинетические свойства антитела. Следовательно, антитела с сконструированными доменами Fc, которые изменили связывание с Fc-рецептором, могут иметь уменьшенные побочные эффекты. Таким образом, В одном варианте осуществления изобретения белок содержит химерный или иным образом модифицированный домен Fc. В качестве примера химерного домена Fc, см. международную публикацию WO 2014/121087 A1, опубликованную 7 августа 2014 г., который включен в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

Термин "EC₅₀" или "EC₅₀", как используется в данном документе, относится к половине максимальной эффективной концентрации, которая включает концентрацию лиганда, который индуцирует ответ, например, клеточный ответ, на полпути между исходным значением и максимумом после указанного времени воздействия. EC₅₀ по существу представляет собой концентрацию лиганда, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. Таким образом, что касается клеточного сигналинга, повышенная активность рецептора наблюдается при сниженном значении EC₅₀, т.е. половина значения максимальной эффективной концентрации (меньше лиганда, необходимого для получения большего ответа).

Используемый в данном документе термин "IC₅₀" или "IC₅₀" относится к половине максимальной ингибирующей концентрации клеточного ответа. Другими словами, измерение эффективности конкретного фрагмента (например, белка, соединения или молекулы) в ингибировании биологической или биохимической функции рецептора, где анализ количественно определяет количество такого фрагмента, необходимое для ингибирования данного биологического процесса. Таким образом, что касается клеточного сигналинга, наблюдается более высокая ингибирующая активность при сниженном значении IC₅₀.

Способы лечения или улучшения сосудистых заболеваний глаз или расстройств

Данное описание включает способы лечения, профилактики или ослабления по меньшей мере одного симптома или признака сосудистого заболевания глаз или расстройства у субъекта. Способы согласно этому аспекту описания включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист APLNR вводят подкожно, внутривенно или интравитреально. В вариантах осуществления изобретения, антагонист APLNR вводят в комбинации с антагонистом VEGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист APLNR вводят интравитреально в комбинации с антагонистом VEGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист APLNR вводят в виде одного комбинированного дозированного состава с антагонистом VEGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист APLNR вводят в комбинации с антагонистом VEGF, причем антагонист APLNR вводят внутривенно, а антагонист VEGF вводят интравитреально. Антагонист VEGF можно вводить до, после или одновременно с антагонистом APLNR.

Данное изобретение частично основано на открытии заявителем того факта, что комбинация антагонизма, направленного против путей VEGF и апелин/APLNR, может преимущественно влиять на нежелательную патологическую васкуляризацию глаза. В частности, заявитель обнаружил, что такие комбинации можно использовать для лечения или профилактики состояний, таких как диабетическая ретинопатия, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию, ретинопатию недоношенных и возрастную макулярную дегенерацию. Добавление антагониста APLNR может улучшить анти-ангиогенные эффекты антагонизма VEGF, когда антагонизм пути VEGF был насыщенным.

Используемые в данном документе термины "лечить", "лечение" или т.п. означают облегчение симптомов, устранение причин симптомов либо на временной, либо на постоянной основе, либо для предотвращения или замедления появления симптомов неоваскулярного заболевания глаз или расстройства. В определенных вариантах осуществления изобретения, данные способы полезны для лечения или улучшения по меньшей мере одного симптома или показания, включая, но не ограничиваясь этим, ангиогенез сетчатки, неоваскуляризацию, пропотевание жидкости из сосудов, утолщение сетчатки в пределах 500 мкм от центра центральной ямки, твердые желтые экссудаты в пределах 500 мкм от центра центральной ямки с прилежащим утолщением сетчатки и по меньшей мере 1 область диска утолщения сетчатки, любая часть которой находится в пределах 1 диаметра диска от центра центральной ямки, размытое зрение, мушки перед глазами, потеря контраста, двоение зрения и возможная потеря зрения. В контексте способов лечения сосудистого заболевания глаз, такого как AMD или DME, термин означает, что от начала лечения субъект проявляет улучшение в виде одной или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) букв на диаграмме остроты зрения раннего лечения диабетической ретинопатии (EDTRS). В определенных вариантах осуществления изобретения, этот термин означает, что с начала лечения у субъекта предотвращается потеря зрения, превышающая или равная 15 буквам.

Используемые в данном документе термины "предотвращать", "предотвращает" или т.п. означают предотвращение развития симптома, показания или осложнения сосудистого заболевания глаз. В контексте способов лечения сосудистого заболевания глаз, такого как AMD или DME, термин означает, что с начала лечения у субъекта предотвращается умеренная или тяжелая потеря зрения.

Используемый в данном документе термин "сосудистое заболевание или расстройство глаз" отно-

сится к заболеванию глаз или расстройствам, которые поражают кровеносные сосуды глаза. Заболевания могут быть вызваны аномальным ангиогенезом (образованием новых кровеносных сосудов) или окклюзией или закупоркой кровеносных сосудов. Используемый в данном документе термин включает заболевания глаз или расстройства, связанные с ангиогенезом. Термин включает, но не ограничивается этим, заболевание или расстройство глаз выбрано из группы, состоящей из диабетической ретинопатии (включая пролиферативную диабетическую ретинопатию), диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскуляризации сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, окклюзии разветвленной вены сетчатки, полипной хориоидальной васкулопатии, хориоидальной неоваскуляризации (CNV), дегенеративной миопии (миопическая CNV), неоваскулярной глаукомы и ретинопатии недоношенных. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин "неоваскулярное заболевание или расстройство глаз" можно использовать взаимозаменяемо с термином "заболевание или расстройство глаз, связанное с ангиогенезом".

В определенных вариантах осуществления изобретения, данное описание включает в себя способы лечения, предотвращения или ослабления по меньшей мере одного симптома или признака заболевания глаз или расстройства, связанного с ангиогенезом у субъекта, причем заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из патологической неоваскуляризации, диабетической ретинопатии (включая пролиферативную диабетическую ретинопатию), диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскуляризации сетчатки, полипной хориоидальной васкулопатии, хориоидальной неоваскуляризации (CNV), дегенеративной миопии (миопическая CNV), неоваскулярной ретинопатии, глаукомы, предрасположенности к глаукоме, и ретинопатии недоношенных. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение антагониста APLNR также способствует нормальной реваскуляризации сетчатки, например, при ретинопатии, вызванной кислородом (OIR).

"Диабетический макулярный отек" (DME) как используется в данном документе относится к серьезному заболеванию глаз, которое поражает людей с диабетом (тип 1 или тип 2). Макулярный отек возникает, когда жидкость из кровеносных сосудов в сетчатке протекает в макулу, и отложения жидкости и белка накапливаются на или под макулой глаза (желтая центральная область сетчатки), что вызывает ее утолщение и опухание (отек). Отек может исказить центральное зрение человека, так как макула находится вблизи центра сетчатки в задней части глазного яблока. Первичные симптомы DME включают, но не ограничиваются ими, расплывчатое зрение, мушки перед глазами, потерю контраста, двоение зрения и возможную потерю зрения. Патология DME характеризуется разрушением гематоэнцефалического барьера, обычно предотвращающего движение воды в сетчатке, что позволяет жидкости накапливаться в ткани сетчатки, и наличием утолщения сетчатки. В данное время DME диагностируется во время осмотра глаза, состоящего из теста остроты зрения, который определяет наименьшие буквы, которые человек может прочитать на стандартизированной диаграмме, расширенного обследования глаза для проверки признаков заболевания, тестов визуализации, таких как оптическая когерентная томография (ОКТ) или флуоресцентная ангиография (ФА) и тонометрия, инструмент, который измеряет давление внутри глаза. Следующие исследования также проводятся для определения лечения: оптическая когерентная томография (ОКТ), флуоресцентная ангиография и цветная стереофоническая фотография глазного дна. DME можно в общих чертах разделить на две основные категории: фокальный и диффузный. Фокальный DME характеризуется специфическими участками отдельных и отчетливых утечек в макуле с достаточным макулярным кровотоком. Диффузный DME возникает в результате утечки всего капиллярного русла, окружающего макулу, в результате разрушения внутреннего барьера кровь-сетчатка глаза. В дополнение к фокальному и диффузному, DME также классифицируется на основании результатов клинического обследования в отношении клинически значимого отека макулы (CSME), не-CSME и CSME с центральным поражением (CSME-CI), которое включает центральную ямку. Данное описание включает способы лечения вышеупомянутых категорий DME.

Возрастная макулярная дегенерация (AMD), как используется в данном документе, относится к серьезному состоянию глаза, когда небольшая центральная часть сетчатки, известная как макула, разрушается. Влажная форма AMD характеризуется ростом аномальных кровеносных сосудов из сосудистой оболочки под макулой. Это называется хориоидальной неоваскуляризацией (CNV). Через эти кровеносные сосуды пропускаются кровь и жидкость в сетчатку, вызывая искажение зрения, при котором прямые линии выглядят волнистыми, а также слепые пятна и потерю центрального зрения. Эти аномальные кровеносные сосуды в конечном итоге рубцуются, что приводит к постоянной потере центрального зрения. Симптомы AMD включают темные, размытые области в центре зрения; и уменьшенное или измененное восприятие цвета. AMD может быть обнаружена при обычном обследовании глаз. Одним из наиболее распространенных ранних признаков макулярной дегенерации является наличие друз - крошечных желтых отложений под сетчаткой - или комкование пигмента.

"Ретинопатия недоношенных" (ROP), как используется в данном документе, также известная как ретролентальная фиброплазия и синдром Терри, относится к состоянию, поражающему недоношенных детей с низким весом при рождении и раннего гестационного срока. Ретинопатия недоношенных возникает, когда развитие нормальных кровеносных сосудов сетчатки прерывается рождением до полного срока гестации, что приводит к аномальному развитию кровеносных сосудов сетчатки. Если состояние

прогрессирует, рост рубцовой ткани может привести к отслоению сетчатки и ухудшению зрения или потере зрения. Патогенез ROP включает в себя две отдельные фазы: вазооблитерационную фазу и вазопротрофиеративную фазу. Нормальный рост сосудов сетчатки задерживается на первой фазе как следствие воздействия гипероксической среды, тогда как вторая фаза включает быстрое увеличение неоваскуляризации с последующим отслоением сетчатки. Аблиация аваскулярной сетчатки с помощью криотерапии или лазерной фотокоагуляции рассматривается как первичное лечение для ROP, и изучаются анти-VEGF методы лечения (например, анти-VEGF антитела). Несмотря на эти варианты лечения, это состояние остается основной причиной ухудшения зрения на протяжении всей жизни, при этом уровень заболеваемости остается относительно постоянным в течение более двадцати лет.

Диабетическая ретинопатия (DR), как используется в данном документе, представляет собой хроническое прогрессирующее заболевание микроциркуляторного русла сетчатки, связанное с длительной гипергликемией. DR является наиболее распространенным микрососудистым осложнением диабета и является растущей глобальной проблемой, поскольку распространенность сахарного диабета продолжает расти во всем мире. Проллиферативная DR (PDR), как используется в данном документе, представляет собой угрожающее зрению осложнение DR и характеризуется развитием аномальных новых сосудов в сетчатке, головке зрительного нерва или переднем сегменте глаза. PDR - это поздняя стадия DR, которая обусловлена гипоксией и экспрессией проангиогенных факторов роста, которые стимулируют aberrантное образование новых кровеносных сосудов в сетчатке, которые выступают в преретинальное пространство. Неоваскуляризация сетчатки может привести к серьезной потере зрения, когда это приводит к кровоизлиянию в стекловидное тело или тракционной отслойке сетчатки. Лазерная фотокоагуляция была стандартом для лечения ПДР в течение многих лет, с более новыми методами лечения, включая внутриглазное лечение анти-VEGF (например, анти-VEGF-антителами) и стероидными агентами, а также витрореетинальную хирургию. Несмотря на эти терапевтические успехи, остаются неудовлетворенные потребности в лечении, особенно неинвазивном, неразрушающем и более длительным вариантам лечения.

Используемое в данном документе выражение "субъект, нуждающийся в этом" означает человека или млекопитающее, отличное от человека, которое проявляет один или более симптомов или признаков, и/или которому был поставлен диагноз заболевания глаз или расстройства, связанного с ангиогенезом. Термин "субъект, нуждающийся в этом" может также включать, например, субъектов, которые до лечения демонстрируют (или демонстрировали) один или более признаков неоваскулярного заболевания глаз, такого как, например, ангиогенез сетчатки, неоваскуляризацию, пропотевание жидкости из сосудов, утолщение сетчатки в пределах 500 мкм от центра центральной ямки, твердые желтые экссудаты в пределах 500 мкм от центра центральной ямки с прилежащим утолщением сетчатки и по меньшей мере 1 область диска утолщения сетчатки, любая часть которой находится в пределах 1 диаметра диска от центра центральной ямки, размытое зрение, мушки перед глазами, потеря контраста, двоение зрения и возможная потеря зрения.

В контексте описания "субъект, нуждающийся в этом" также включает человека или млекопитающее, отличное от человека, которое имеет сосудистое заболевание или расстройство глаз, выбранное из группы, состоящей из диабетической ретинопатии (включая пролиферативную диабетическую ретинопатию), диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскуляризации сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, окклюзии разветвленной вены сетчатки, полипозной хориоидальной васкулопатии, хориоидальной неоваскуляризации (CNV), дегенеративной миопии (миопическая CNV), неоваскулярной глаукомы и ретинопатии недоношенных.

В контексте данного описания "субъект, нуждающийся в этом" может включать подгруппу популяции, которая более восприимчива к DME или AMD, или может демонстрировать повышенный уровень связанного с DME или связанного с AMD биомаркера, или биомаркера, связанного с ROP или PDR. Например, "субъект, нуждающийся в этом" может включать субъекта, страдающего диабетом более чем 10 лет, или субъекта, у которого часто бывают высокие уровни сахара в крови или высокие уровни глюкозы в крови натощак. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин "субъект, нуждающийся в этом" включает субъекта, которому до или во время введения антагониста APLNR и/или антагониста VEGF был диагностирован или диагностирован диабет. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин "субъект, нуждающийся в этом" включает субъекта, которому до или во время введения антагониста APLNR и/или антагониста VEGF было более 50 лет. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин "субъект, нуждающийся в этом" включает субъектов, которые являются курильщиками, или субъектов с высоким кровяным давлением или высоким уровнем холестерина.

Данное описание включает способы лечения, профилактики или снижения тяжести сосудистого заболевания глаз, включающие введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR в комбинации с антагонистом VEGF, субъекту, нуждающемуся в этом, причем фармацевтическая композиция вводится субъекту в нескольких дозах, например, как часть определенной схемы терапевтического дозирования. Например, режим терапевтического дозирования может включать введение субъекту множества доз фармацевтической композиции с частотой около один раз в день, один раз каждые два дня, один раз каждые три дня, один раз каждые четыре дня, один раз каждые пять дней, один раз каждые шесть дней, раз в неделю, раз в две недели, раз в три неде-

ли, раз в четыре недели, раз в месяц, раз в два месяца, раз в три месяца, раз в четыре месяца или реже. В определенных вариантах осуществления изобретения, схема терапевтического дозирования может включать введение субъекту множества доз фармацевтической композиции с частотой один раз в день или два раза в день или более.

Данное описание также включает способы ингибирования, уменьшения или подавления протекания жидкости из сосудов у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы в соответствии с этим аспектом описания включают в себя введение субъекту одной или более доз фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR в комбинации с антагонистом VEGF, чтобы уменьшить или ингибировать протекание жидкости сосудов в глазу субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения протекание жидкости сосудов ингибируется в течение более 3 недель, более 4 недель, более 8 недель или более 10 недель по сравнению с субъектом, которому вводили только антагонист VEGF.

Способы по данному описанию в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, включают введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR в комбинации с антагонистом VEGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист APLNR можно вводить в сочетании с терапией, включающей лазерное лечение, для остановки протекания в макулу. Используемое в данном документе выражение "в сочетании с" означает, что фармацевтическая композиция, содержащая антагонист APLNR, вводится субъекту одновременно, непосредственно перед или сразу после введения антагониста VEGF. Используемое в данном документе выражение "в сочетании с" означает, что фармацевтическая композиция, содержащая антагонист APLNR, вводится субъекту одновременно, непосредственно перед или сразу после введения антагониста VEGF. В определенных вариантах осуществления изобретения, антагонист VEGF вводят в виде совместного препарата с антагонистом APLNR. В связанном варианте осуществления изобретения, данное описание включает способы, включающие введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR, субъекту, чтобы обеспечить больший терапевтический эффект или синергетический эффект по сравнению с введением только антагониста VEGF. Субъект может находиться на терапевтической схеме введения антагониста VEGF при интравитреальном введении. В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист APLNR добавляют к этой терапевтической схеме, в которой одна или более интравитреальных инъекций антагониста VEGF могут быть уменьшены или может быть увеличена продолжительность между последовательными интравитреальными инъекциями.

Способы по данному описанию пригодны для лечения или профилактики сосудистых расстройств глаз у субъектов, у которых диагностирован или есть риск поражения глаз сосудистым расстройством. Как правило, способы по данному описанию демонстрируют эффективность в течение 36 недель после начала схемы лечения (с начальной дозой, вводимой в "неделю 0"), например, к концу недели 6, к концу недели 12, к концу недели 18, к концу недели 24 и т.д. В контексте способов лечения ангиогенных расстройств глаз, таких как AMD и DME, "эффективность" означает, что с начала лечения у субъекта наблюдается потеря 10 или менее букв на графике остроты зрения "Исследование ранней терапии диабетической ретинопатии" (ETDRS). В некоторых вариантах осуществления изобретения "эффективность" означает увеличение на одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или более) букв на диаграмме ETDRS со времени начала лечения.

Например, режим терапевтического дозирования может включать введение субъекту множества доз фармацевтической композиции с частотой около один раз в день, один раз каждые два дня, один раз каждые три дня, один раз каждые четыре дня, один раз каждые пять дней, один раз каждые шесть дней, раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в месяц, раз в два месяца, раз в три месяца, раз в четыре месяца или реже. В определенных вариантах осуществления изобретения, схема терапевтического дозирования может включать введение субъекту множества доз фармацевтической композиции с частотой один раз в день или два раза в день или более.

Антагонисты APLNR.

Данное описание включает способы лечения, профилактики или ослабления по меньшей мере одного симптома или признака сосудистого заболевания глаз или расстройства у субъекта, включающие введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR, субъекту, нуждающемуся в этом. Антагонисты APLNR включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, низкомолекулярные ингибиторы сигнального пути рецептора апелина и пептидные ингибиторы сигнального пути рецептора апелина. Иллюстративные низкомолекулярные ингибиторы или антагонисты APLNR можно найти в патентных публикациях США № US 2014000518 и US 20150125459 и международных патентных публикациях № WO 2004081198 и WO 2015140296. Иллюстративные пептидные ингибиторы или антагонисты APLNR можно найти в патентах США № 9593153 и 7736646 и международной публикации патента WO 2004081198. Другие антагонисты APLNR включают MM54, MM07, N-альфа-ацетил-нона-D-аргинин амида (ALX40-4C), ML221, мутант апелин-13 (F13A), 4-оксо-6-((пиримидин-2-илтио)метил)-4Н-пиран-3-ил-4-нитробензоат (M1221) и E339-3D6.

Антагонисты APLNR включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, выбранные из

группы антител, описанных в международной патентной публикации № WO 2015077491, опубликованной 5 мая 2015 г., которая специально включена в данный документ во всей своей полноте и в патент США № 9493554. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела представляют собой H2aM9232N, H4H9232N или H1M9207N. В одном варианте осуществления изобретения анти-APLNR антитело представляет собой H4H9232N.

Антагонисты APLNR включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, выбранные из группы, содержащей вариабельный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 13, или по существу сходную их последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Антагонисты APLNR включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вариабельный участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 18, или по существу сходную их последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Согласно определенным вариантам осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR тяжелой и легкой цепи, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 и 6 (например, H1M9207N) и SEQ ID NO: 12 и 17 (например, H2aM9232N или H4H9232N).

Некоторые неограничивающие, иллюстративные антитела и антигенсвязывающие фрагменты по описанию содержат домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-4-5-8-9-10 (например, H1M9207N); и SEQ ID NO: 14-15-16-19-20-21 (например, H2aM9232N или H4H9232N). Антитела, обозначенные H2aM9232N и H4H9232N, имеют одни и те же вариабельные участки человека (HCVR и LCVR). H2aM9232N содержит константный участок тяжелой цепи мышиного IgG2a, тогда как H4H9232N содержит константный участок тяжелой цепи человеческого IgG4.

Антагонисты APLNR включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/7 и 13/18.

Антагонисты APLNR включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие домен CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 16, или по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 21, или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по крайней мере 99% идентичности последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонисты APLNR включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5/10 и 16/21.

Антагонисты APLNR включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие домен CDR1 (HCDR1) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 14, или по существу ее аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 15, или по существу ее аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 19, или по существу ее аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR2 (LCDR2) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 20, или по существу ее аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Некоторые неограничивающие иллюстративные анти-APLNR антитела включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое специфически связывает APLNR, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит домены CDR тяжелой и легкой цепи, содержащиеся в вариабельном участке последовательности тяжелой и легкой цепи (HCVR/LCVR), выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/7 и 13/18.

Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут быть использованы для идентификации CDR в ука-

занных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в данном документе. Иллюстративные условные обозначения, которые могут быть использованы для определения границ CDR, включают в себя, например, определение по Кабат, определение по Хотиа и определение по АтМ. В общем случае определение по Кабат основано на вариабельности последовательности, определение по Хотиа основано на положении структурных петлевых областей, а определение по АтМ является компромиссным решением между подходами Кабат и Хотиа. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948; Martin et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 9268-9272. Базы данных общего пользования также доступны для идентификации последовательностей CDR в антителе.

Данное описание относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим тяжелую цепь (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 13, или по существу сходную ее последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное описание также относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту антитела, содержащему легкую цепь (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 18, или по существу сходную ее последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему пару аминокислотных последовательностей HC и LC (HC/LC).

Согласно определенным вариантам осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR тяжелой и легкой цепи, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты антител H1M9207N или H2aM9232N (или H4H9232N).

Данное описание включает анти-APLNR антитела, имеющие модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых применениях может быть полезна модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, или антитело, в котором отсутствует фукозная часть, присутствующая в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см. Shield et al., 2002, JBC, 277: 26733). В других применениях можно модифицировать галактозилирование, чтобы модифицировать комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

Например, данное описание включает в себя антагонисты APLNR, которые блокируют или ингибируют опосредованный апелином сигналинг в клетках, экспрессирующих APLNR человека, с IC_{50} менее чем около 20 нМ, менее чем около 10 нМ, менее чем около 2 нМ, менее чем около 1 нМ, менее чем около 900 пМ, менее чем около 800 пМ, менее чем около 700 пМ, менее чем около 600 пМ, менее чем около 500 пМ, менее чем около 400 пМ, менее чем около 350 пМ, менее чем около 300 пМ, менее чем около 250 пМ, менее чем около 200 пМ, менее чем около 150 пМ, менее чем около 100 пМ, менее чем около 90 пМ, менее чем около 80 пМ, менее чем около 70 пМ, менее чем около 60 пМ, менее чем около 50 пМ, менее чем около 40 пМ, менее чем около 30 пМ, менее чем около 20 пМ или менее чем около 10 пМ, как измерено в биоанализе на основе блокирования или ингибирования на клетках, например, с использованием формата анализа, как определено в примерах 5, 8, 9 или 11 WO 2015/077491 или по существу аналогичного анализа.

Данное описание включает антагонисты APLNR, которые ингибируют APLNR-опосредованное соотношение pERK в присутствии апелина с IC_{50} менее чем около 50 нМ, менее чем около 25 нМ, менее чем около 20 нМ, менее чем около 15 нМ, менее чем около 10 нМ, менее чем около 5 нМ, менее чем около 1 нМ, менее чем около 900 пМ, менее чем около 800 пМ, менее чем около 700 пМ, менее чем около 600 пМ, менее чем около 500 пМ, менее чем около 400 пМ или менее чем около 300 пМ, как измерено в APLNR-индуцированном анализе pERK.

В других вариантах осуществления изобретения однако, некоторые антагонисты APLNR по данному изобретению, несмотря на способность ингибировать или ослаблять APLNR-опосредованный сигналинг, не блокируют или только частично блокируют взаимодействие APLNR и апелина. Такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут упоминаться в данном документе как "непрямые блокаторы". Не будучи связанными теорией, полагают, что косвенные блокаторы описания функционируют путем связывания с APLNR в эпитопе, который не перекрывается или частично перекрывается с доменом связывания N-концевого лиганда APLNR, но тем не менее мешает APLNR-опосредованному сигналингу без непосредственного блокирования взаимодействия APLNR/апелин.

Данное описание включает антагонисты APLNR, которые связывают растворимые молекулы APLNR с высокой аффинностью и/или специфичностью. Например, данное описание включает в себя антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают APLNR с коэффициентом связывания, более чем около 20, как измерено анализом флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS), например, с использованием формата анализа, как определено в примере 4 WO 2015/077491. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению связывают APLNR с коэффициентом связывания более чем около 15, более чем около

20, более чем около 100, более чем около 200, более чем около 300, более чем около 400, чем около 500, более чем около 1000, более чем около 1500, или более чем около 2000, как измерено, например, с помощью FACS или по существу аналогичного анализа.

Данное описание также включает анти-APLNR антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с APLNR с периодом диссоциативного полураспада ($t_{1/2}$), более чем около 10 мин, как измерено поверхностным плазмонным резонансом при 25 или 37°C, например, с использованием хорошо известного формата анализа BIAcore™ или по существу аналогичного анализа.

Антитела по данному изобретению могут обладать одной или более вышеупомянутыми биологическими характеристиками или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики антител по данному описанию станут очевидными для специалиста в данной области техники из обзора данного описания, включая рабочие примеры, приведенные в данном документе.

Анти-APLNR антитела могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR участках переменных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации могут быть легко определены с помощью сравнения аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из баз данных антител общего пользования. Данное описание включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе, при этом один или более аминокислот в одном или более каркасных участках и/или CDR участках мутированы до соответствующего(их) остатка(ов) последовательности зародышевой линии, из которой антитело происходило, или до соответствующего(их) остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии человека или до консервативной аминокислотной замены соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе совместно как "зародышевые мутации"). Специалист в данной области техники, начиная с последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепи, раскрытых в данном документе, может легко получать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах V_H и/или V_L мутируют обратно к остаткам, обнаруженным в исходной последовательности зародышевой линии, из которой антитело происходило. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутируют обратно к исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько каркасных остатков и/или остатков CDR мутируют до соответствующего остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело изначально происходило). Кроме того, антитела по данному описанию могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных областях и/или CDR участках, например, при этом определенные отдельные остатки мутируются до соответствующего остатка определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или мутируют до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко исследованы в отношении одного или более необходимых свойств, таких как повышенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или повышенные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), ослабленная иммуногенность и т.п. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью этого общего подхода, включены в данное описание.

Данное описание также включает анти-APLNR антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе, имеющих одну или более консервативных замен. Например, данное описание включает в себя анти-APLNR антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и др. консервативными аминокислотными заменами по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в переменной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфо-

рильных групп или сульфонильных групп на антигене.

Термин "значительная идентичность" или "по сути идентичный", при обозначении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента, указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) присутствует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере в около 95% и более предпочтительно по меньшей мере в около 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, измеренная с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, по сути идентичная эталонной молекуле нуклеиновой кислоты, в определенных случаях кодирует полипептид, имеющий такую же или по сути аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "значительное сходство" или "по сути аналогичный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, имеют последовательность, идентичную по меньшей мере на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98 или 99%. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой таковую, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена не будет по сути изменять функциональные свойства белка. В случаях когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень сходства могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы исправить консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson, 1994, *Methods Mol. Biol.*, 24: 307-331, включенную в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают в себя

- (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин;
- (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин;
- (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин;
- (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан;
- (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин;
- (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат; и
- (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин.

Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al., 1992, *Science*, 256: 1443-1445, включенной в данный документ посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. С помощью программного обеспечения для анализа белка подбирают аналогичные последовательности, применяя измерения сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут быть применены с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать, используя FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает идентичность выравниваний и процентную идентичность последовательности областей наилучшего перекрытия между искомой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson (1994), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по данному описанию с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410; и Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-402, каждая из которых включена в данное описание в качестве ссылки.

Данное описание дополнительно включает анти-APLNR антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, H1M9207N и H2aM9232N и H4H9232N). Аналогичным образом, данное описание также включает

анти-APLNR антитела, которые конкурируют за связывание с APLNR с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, H1M9207N и H2aM9232N и H4H9232N).

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же самым эпитопом, что и эталонное анти-APLNR антитело, или конкурирует за связывание с ним с помощью стандартных способов, известных в данной области техники и приведенные в качестве примера в данном документе. Например, для определения того, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное анти-APLNR антитело по изобретению, эталонному антителу позволяют связываться с белком APLNR. Затем определяют способность исследуемого антитела связываться с молекулой APLNR. Если исследуемое антитело способно связываться с APLNR после насыщающего связывания с эталонным анти-APLNR антителом, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное анти-APLNR антитело. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с молекулой APLNR после насыщающего связывания с эталонным анти-APLNR антителом, тогда тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный с эталонным анти-APLNR антителом описания. Затем может быть проведен дополнительный стандартный эксперимент (например, анализ пептидных мутаций и связывания) для подтверждения того, связано ли фактически наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела со связыванием с тем же самым эпитопом, что и эталонное антитело или отвечает ли стерическое блокирование (или другое явление) за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого типа могут быть выполнены с помощью ИФА, РИА (радиоиммунологического анализа), BIAcore™, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в данной области техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения, два антитела связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90% или даже на 99%, как измерено в конкурентном анализе связывания (см., например, Junghans et al., 1990, Cancer Res., 50: 1495-1502). В альтернативном варианте два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Считается, что два антитела имеют "перекрывающиеся эпитопы", если только подмножество аминокислотных мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание (или перекрестно конкурирует за связывание) с эталонным анти-APLNR антителом, описанную выше методику связывания выполняют в двух направлениях: в первом направлении эталонное антитело связывают с белком APLNR в условиях насыщения, за которым следует определение связывания исследуемого антитела с молекулой APLNR. Во втором направлении исследуемое антитело связывают с молекулой APLNR в условиях насыщения с последующим определением связывания эталонного антитела с молекулой APLNR. Если в обоих направлениях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой APLNR, то делается вывод, что исследуемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с APLNR. Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

В определенных вариантах осуществления описания, анти-APLNR антитела по данному описанию представляют собой антитела человека. Термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, предполагает включение в себя антител, имеющих переменные и константные участки, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела по данному описанию могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, вводимые с помощью случайного или сайтспецифического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин "человеческое антитело", как он используется в данном документе, не предполагает включение антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека. В различных вариантах осуществления изобретения, обсуждаемые в данном документе антитела представляют собой человеческие антитела с константным участком тяжелой цепи IgG. В некоторых случаях антитела имеют константный участок тяжелой цепи изотипа IgG1 или IgG4 человека.

Антитела по изобретению могут в некоторых вариантах осуществления изобретения представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. Термин "рекомбинантное человеческое антитело", как используется в данном документе, предназначен для включения всех его человеческих антител, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные от животного (например, мы-

ши), которое трансгенно для генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al., 1992, Nucl. Acids Res., 20: 6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает в себя сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления изобретения такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или, когда используют трансгенное для человеческих последовательностей Ig животное, соматический мутагенез *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности участков V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и связаны с ними, в естественных условиях не могут существовать в репертуаре зародышевой линии человеческого антитела *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию с массой приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе дисульфидной связью тяжелой цепи. Во второй форме димеры не связаны через междоцепочечные дисульфидные связи, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полу-антитела). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных интактных изоформах IgG обусловлена, но не ограничивается структурными различиями, связанными с изоформой шарнирного участка антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирном участке петли человеческого IgG4 может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al., 1993, Molecular Immunology, 30: 105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира человеческого IgG1. Данное описание охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнирном, C_H2 или C_H3 участке, которые могут быть желательны, например, при производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

Антитела по описанию могут быть изолированными антителами. "Выделенное антитело", как используется в данном документе, означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено по меньшей мере из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани, или клетки, в которой антитело существует в природе или продуцируется естественным путем, является "выделенным антителом" для целей данного описания. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения, выделенное антитело может быть по существу не содержащим другого клеточного материала и/или химических веществ.

Данное описание включает в себя нейтрализующие и/или блокирующие анти-APLNR антитела. "Нейтрализующее" или "блокирующее" антитело, как используется в данном документе, предназначено для обозначения антитела, связывание которого с APLNR

(i) вмешивается во взаимодействие между APLNR или фрагментом APLNR и компонентом рецептора APLNR (например, пептидом апелина, и т.д.); и/или

(ii) приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической функции APLNR.

Ингибирование, вызванное нейтрализующим или блокирующим антителом APLNR, необязательно должно быть полным, если его можно обнаружить с помощью соответствующего анализа.

Антагонисты VEGF.

Используемый в данном документе термин "антагонист VEGF" представляет собой любой агент, который связывается или взаимодействует с VEGF, ингибирует связывание VEGF с его рецепторами (VEGFR1 и VEGFR2) и/или ингибирует биологический сигналинг и активность VEGF. Антагонисты VEGF включают молекулы, которые препятствуют взаимодействию между VEGF и природным рецептором VEGF, например, молекулы, которые связываются с VEGF или рецептором VEGF и предотвращают или иным образом препятствуют взаимодействию между VEGF и рецептором VEGF. Конкретные иллюстративные антагонисты VEGF включают анти-VEGF антитела (например, ранибизумаб [LUCENTIS®]), анти-VEGF рецептора антитела (например, анти-VEGFR1 антитела, анти-VEGFR2 антитела и т.д.), низкомолекулярные ингибиторы VEGF (например, сунитиниб) и химерные молекулы на основе рецептора VEGF или слитые белки, ингибирующие VEGF (также называемые в данном документе "VEGF ловушками"), такие как афлиберцепт и зив-афлиберцепт. Другими примерами ловушек VEGF являются ALT-L9, M710, FYB203 и CHS-2020. Дополнительные примеры ловушек VEGF можно найти в патентах США № 7070959, 7306799, 7374757, 7374758, 7531173, 7608261, 5952199, 6100071, 6383486, 6897294 и 7771721, которые специально включены в данное описание посредством ссылки. Дополнительные ингибиторы и/или антагонисты VEGF включают ингибиторы малых молекул: пазопаниб, сорафениб, акситиниб, понатиниб, регорафениб, кабозантиниб, вандетаниб, кабозантиниб и ленватиниб; и антитела, ингибирующие VEGF: бевацизумаб и рамуцизумаб или их биоподобные молекулы.

Химерные молекулы на основе рецептора VEGF включают химерные полипептиды, которые со-

держат два или более иммуноглобулин (Ig)-подобных домена рецептора VEGF, таких как VEGFR1 (также называемый Flt1) и/или VEGFR2 (также называемый Flk1 или KDR), и также может содержать мультимеризующий домен (например, домен Fc, который облегчает мультимеризацию [например, димеризацию] двух или более химерных полипептидов). Иллюстративная химерная молекула на основе рецептора VEGF представляет собой молекулу, обозначаемую как VEGFR1R2-FcΔC1 (a) (также известную как афлиберцепт; продается под названием продукта EYLEA®). В некоторых вариантах осуществления изобретения афлиберцепт содержит аминокислотную последовательность, представленную в виде

```
MVSYWDTGVLLCALLSCLLTGSSSGSDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSP
NITVTLLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHR
QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNVDNFWEYPSSKHQHKLVNRDLK
TQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQIDNO: 23).
```

Количество антагониста VEGF, содержащегося в фармацевтических составах по данному изобретению, может варьироваться в зависимости от конкретных свойств, желательных для составов, а также от конкретных обстоятельств и целей, для которых составы предназначены для использования. В определенных вариантах осуществления изобретения, фармацевтические составы представляют собой жидкие составы, которые могут содержать от $5 \pm 0,75$ до $150 \pm 22,5$ мг/мл антагониста VEGF; от $10 \pm 1,5$ до $100 \pm 15,0$ мг/мл антагониста VEGF; от 20 ± 3 до 80 ± 12 мг/мл антагониста VEGF; от $30 \pm 4,5$ до $70 \pm 10,5$ мг/мл антагониста VEGF или $40 \pm 6,0$ мг/мл антагониста VEGF. Например, составы по данному изобретению могут содержать около 20 мг/мл; около 30 мг/мл; около 40 мг/мл; около 50 мг/мл; или около 60 мг/мл антагониста VEGF.

Способы по данному изобретению включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей антагонист VEGF.

Терапевтический состав и введение.

Данное описание обеспечивает фармацевтическим составам, содержащим по меньшей мере один антагонист APLNR, такой как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с APLNR человека. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления изобретения, данное изобретение относится к фармацевтическим составам, содержащим дополнительные терапевтические агенты. Данное описание дополнительно обеспечивает фармацевтические препараты, содержащие по меньшей мере один антагонист VEGF, например, для применения в сочетании с фармацевтическим составом, содержащим по меньшей мере один антагонист APLNR.

Фармацевтические композиции по изобретению составлены с подходящими носителями, эксципиентами и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. Множество подходящих составов можно найти в фармакологическом справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Эти составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липид-содержащие (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле", эмульсии на основе карбовакса (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA (1998), J. Pharm. Sci. Technol., 52:238-311.

Доза антагониста APLNR, такого как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с APLNR человека, вводимая субъекту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера субъекта, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. Предпочтительная доза обычно рассчитывается в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. Когда антагонист APLNR используется для лечения состояния или заболевания, может быть выгодно внутривенно вводить антитело по данному изобретению обычно в однократной дозе от около 0,01 мг/кг до около 50 мг/кг массы тела. В других случаях может быть выгодно вводить антагонист APLNR внутривенно, например, в концентрации от около 0,01 мг/кг до около 50 мг/кг массы тела. В зависимости от степени тяжести патологического состояния, частота и длительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозы и схемы введения антагониста APLNR, такого как анти-APLNR антитело, могут быть определены опытным путем; например, прогресс субъекта может контролироваться путем периодической оценки, и доза корректируется соответствующим образом. Кроме того, межвидовое масштабирование доз может быть выполнено с использованием хорошо известных в данной области способов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res., 8: 1351).

Доза антагониста VEGF может варьироваться в зависимости от возраста и размера субъекта, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. Предпочтительная доза обычно рассчитывается в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. Когда антагонист VEGF используется для ле-

чения состояния или заболевания, может быть выгодно внутривенно вводить антитело по данному изобретению обычно в однократной дозе от около 0,01 мг/кг до около 50 мг/кг массы тела. В других случаях может быть выгодно вводить антагонист VEGF внутривенно, например, в концентрации от около 0,01 мг/кг до около 50 мг/кг массы тела. В зависимости от степени тяжести патологического состояния, частота и длительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозы и схемы введения антагониста VEGF могут быть определены опытным путем; например, прогресс субъекта может контролироваться путем периодической оценки, и доза корректируется соответствующим образом. Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по данному описанию, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432). Способы введения включают в себя, но не ограничиваясь ими, внутривенные, внутримышечные, интраперитонеальные, интравитреальные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и пероральные пути введения. Композиция может быть введена с помощью любого удобного пути, например, с помощью инфузии или болюсной инъекции, с помощью всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и тонкого кишечника и т.п.), а также может быть введена совместно с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным.

Данное описание включает способы, которые включают введение антагониста APLNR субъекту, причем антагонист APLNR содержится в фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция дополнительно содержит антагонист VEGF. В альтернативных вариантах осуществления изобретения, антагонист APLNR и антагонист VEGF каждый может быть в своем собственном отдельном составе фармацевтического препарата. Фармацевтические композиции по изобретению могут быть составлены с подходящими носителями, эксципиентами и другими агентами, которые обеспечивают подходящий перенос, доставку, переносимость и т.п. Множество подходящих составов можно найти в фармакологическом справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Эти составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липидсодержащие (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле", эмульсии на основе карбовакса (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA (1998), J. Pharm. Sci. Technol., 52: 238-311.

Используемое в данном документе выражение "фармацевтическая композиция" означает комбинацию по меньшей мере одного активного ингредиента (например, малой молекулы, макромолекулы, соединения и т.д., которая способна оказывать биологическое действие на человека или животное, отличное от человека), и по меньшей мере один неактивный ингредиент, который в сочетании с активным ингредиентом или одним или более дополнительными неактивными ингредиентами подходит для терапевтического введения человеку или животному, отличному от человека. Термин "состав", используемый в данном документе, означает "фармацевтический состав", если специально не указано иное.

Количество антагониста APLNR, такого как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащегося в фармацевтических составах по данному изобретению, может варьироваться в зависимости от конкретных свойств, желательных для составов, а также от конкретных обстоятельств и целей, для которых составы предназначены для применения. В определенных вариантах осуществления изобретения, фармацевтические препараты представляют собой жидкие препараты, которые могут содержать от $5 \pm 0,75$ до $150 \pm 22,5$ мг/мл антитела; от $7,5 \pm 1,125$ до 140 ± 21 мг/мл антитела; от $10 \pm 1,5$ до $130 \pm 19,5$ мг/мл антитела; $10 \pm 1,5$ мг/мл антитела; 20 ± 3 мг/мл антитела; 60 ± 9 мг/мл антитела; или 120 ± 18 мг/мл антитела. Например, составы по данному изобретению могут содержать около 10 мг/мл; около 20 мг/мл; около 40 мг/мл; около 60 мг/мл; около 80 мг/мл; около 100 мг/мл; около 120 мг/мл; или около 140 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с APLNR человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические составы представляют собой жидкие препараты, которые могут содержать от $5 \pm 0,75$ до 100 ± 15 мг/мл антагониста VEGF. Например, составы по данному изобретению могут содержать около 5 мг/мл; около 10 мг/мл; около 15 мг/мл; около 20 мг/мл; около 25 мг/мл; около 30 мг/мл; около 35 мг/мл; около 40 мг/мл; около 50 мг/мл; около 60 мг/мл; около 70 мг/мл; около 80 мг/мл; около 90 мг/мл; или около 100 мг/мл антагониста VEGF, такого как афлиберцепт.

В определенных вариантах осуществления изобретения, фармацевтические составы представляют собой стабильные жидкие совместные составы, содержащие от около 5 мг/мл до около 150 мг/мл антагониста APLNR и от около 5 до 100 мг/мл антагониста VEGF.

Фармацевтические препараты по данному описанию содержат один или более эксципиентов. Тер-

мин "эксципиент" в контексте данного описания означает любой нетерапевтический агент, добавляемый в состав для обеспечения желаемой консистенции, вязкости или стабилизирующего эффекта.

Иллюстративные составы, содержащие антагонист VEGF, которые можно использовать в контексте данного описания, описаны, например, в патенте США № 7531173 и 7608261. Иллюстративные фармацевтические композиции, содержащие антагонист APLNR, которые можно использовать в контексте данного описания, описаны, например, в публикации заявки на патент США № 20130186797. Иллюстративные фармацевтические композиции, содержащие антагонист APLNR, которые можно использовать в контексте данного описания, описаны, например, в международной патентной публикации № WO 2016085750 и публикации патентной заявки США № US 20110027286.

Комбинированные виды терапии.

Способы по данному описанию в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения включают введение субъекту антагониста APLNR в комбинации с антагонистом VEGF. Как используется в данном документе, выражение "в сочетании с" означает, что антагонист VEGF, вводят до, после или одновременно с фармацевтической композицией, содержащей антагонист APLNR. Термин "в сочетании с" также включает последовательное или сопутствующее введение антагониста APLNR и антагониста VEGF. Например, при введении "перед" фармацевтическая композиция, содержащая антагонист APLNR, может быть введена за более чем 72 ч, около 72 ч, около 60 ч, около 48 ч, около 36 ч, около 24 ч, около 12 ч, около 10 ч, около 8 ч, около 6 ч, около 4 ч, около 2 ч, около 1 ч, около 30 мин, около 15 мин или около 10 мин до введения фармацевтической композиции, содержащей антагонист VEGF. При введении "после" фармацевтическая композиция, содержащая антагонист APLNR может быть введена за около 10 мин, около 15 мин, около 30 мин, около 1 ч, 2 ч, около 4 ч, около 6 ч, около 8 ч, около 10 ч, около 12 ч, около 24 ч, около 36 ч, около 48 ч, около 60 ч, около 72 ч, или более чем 72 ч после введения фармацевтической композиции, содержащей антагонист VEGF. Введение "одновременно" с фармацевтической композицией, содержащей антагонист APLNR, означает, что антагонист VEGF вводят субъекту в отдельной лекарственной форме в течение менее чем 5 мин (до, после или в то же время) от введения фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR, или вводят субъекту в виде одной комбинированной лекарственной формы, содержащей антагонист APLNR и антагонист VEGF.

Комбинированная терапия может включать антагонист APLNR и антагонист VEGF (например, афлиберцепт, ловушку VEGF, см., например, патент США № 7087411 (также называемый в данном документе "слитый белок, ингибирующий VEGF"), анти-VEGF антитело (например, ранибизумаб и др.), низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб) и др.

Способы по данному изобретению включают введение антагониста APLNR в комбинации с антагонистом VEGF для аддитивной или синергической активности для лечения или ослабления по меньшей мере одного симптома или признака заболевания глаз или расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабетической ретинопатии (включая пролиферативную диабетическую ретинопатию), диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскуляризации сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, окклюзии разветвленной вены сетчатки, полипной хориоидальной васкулопатии, хориоидальной неоваскуляризации (CNV), дегенеративной миопии (миопическая CNV), неоваскулярной глаукомы и ретинопатии недоношенных.

Контейнеры и способы введения.

Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по данному описанию, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432). Способы введения включают в себя, но не ограничиваясь ими, внутрикожные, внутримышечные, интраперитонеальные, внутривенные, интравитреальные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и пероральные пути введения. Композиция может быть введена с помощью любого удобного пути, например, с помощью инфузии или болюсной инъекции, с помощью всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и тонкого кишечника и т.п.), а также может быть введена совместно с другими биологически активными агентами.

Для лечения заболеваний глаз фармацевтические композиции по изобретению могут быть введены, например, в виде глазных капель, субконъюнктивной инъекции, субконъюнктивного имплантата, интравитреальной инъекции, интравитреального имплантата, субтеноновой инъекции или субтенонового имплантата.

Фармацевтическая композиция по данному описанию может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в случае подкожной доставки шприц-ручка легко находит применения при доставке фармацевтической композиции по данному описанию. Такая шприц-ручка может быть многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприц-ручке, как правило, используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Непосредственно после того, как всю фармацевтическую композицию в картридже вводят и картридж становится пустым, пустой картридж можно сразу выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацев-

тическую композицию. Затем шприц-ручка может быть повторно использована. В одноразовой шприц-ручке сменный картридж отсутствует. Предпочтительно одноразовая шприц-ручка приходит заполненной фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри изделия. Непосредственно после того, как резервуар освобождают от фармацевтической композиции, все изделие выбрасывают.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе контролируемого высвобождения. В одном варианте осуществления изобретения может быть использован насос. В другом варианте осуществления изобретения могут быть использованы полимерные материалы; см. *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Fla. В еще одном варианте осуществления изобретения, система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, что требует только доли системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, p. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, *Science*, 249: 1527-1533.

Инъекционные формы могут включать в себя лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутримышечных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.п. Эти инъекционные формы могут быть получены известными способами. Например, инъекционные формы, могут быть получены, например, с помощью растворения, суспендирования или эмульгирования антигена или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно применяемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существуют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т.п., которые могут быть использованы в комбинации с соответствующим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.п. В качестве маслянистой среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.п., которые могут быть использованы в комбинации с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.п. Инъекцию, полученную таким образом, предпочтительно заполняют в соответствующую ампулу.

Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, получают в лекарственных формах в однократной дозе, подходящей для соответствия дозе действующих веществ. Такие лекарственные формы в разовой дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д.

Фармацевтические составы по данному описанию могут содержаться в любом контейнере, подходящем для хранения или введения лекарств и других терапевтических композиций. Например, фармацевтические составы могут содержаться в герметичном и стерилизованном пластиковом или стеклянном контейнере, имеющем определенный объем, таком как флакон, ампула, шприц, картридж, бутылка или пакет для внутривенного введения. Флаконы различных типов могут быть использованы для содержания составов по данному описанию, включая, например, прозрачные и непрозрачные (например, янтарные) стеклянные или пластиковые флаконы. Аналогично, любой тип шприца может быть использован для содержания или введения фармацевтических составов по данному описанию.

Фармацевтические составы по данному описанию могут содержаться в шприцах "нормального вольфрама" или шприцах "низкого вольфрама". Как будет понятно специалистам в данной области техники, процесс изготовления стеклянных шприцев обычно включает использование горячего вольфрамового стержня, который служит для прокалывания стекла, создавая тем самым отверстие, из которого можно вытягивать и выталкивать жидкости из шприца. Этот процесс приводит к отложению следовых количеств вольфрама на внутренней поверхности шприца. Последующая промывка и другие этапы обработки могут быть использованы для уменьшения количества вольфрама в шприце. Используемый в данном документе термин "нормальный вольфрам" означает, что шприц содержит больше или равное 500 частям на миллиард (ppm) вольфрама. Термин "низкий вольфрам" означает, что шприц содержит менее чем 500 частей на миллиард вольфрама. Например, шприц с низким содержанием вольфрама, согласно данному описанию, может содержать менее чем около 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или менее частей на миллиард вольфрама.

Резиновые поршни, используемые в шприцах, и резиновые пробки, используемые для закрытия отверстий флаконов, могут быть покрыты оболочкой, чтобы предотвратить загрязнение лекарственного содержимого шприца или флакона или сохранить их стабильность. Таким образом, фармацевтические составы по данному описанию в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения могут содержаться в шприце, который содержит поршень с покрытием, или во флаконе, который герметично закрыт резиновой пробкой с покрытием. Например, поршень или пробка могут быть покрыты фторуглеродной пленкой. Примеры покрытых пробок или поршней, подходящих для использования с флаконами и шприцами, содержащими фармацевтические составы по данному описанию, упомянуты, например, в патентах США № 4997423; 5908686; 6286699; 6645635; и 7226554, содержание которых полностью включено в данное описание посредством ссылки. Конкретные иллюстративные покрытые резиновые пробки и поршни, которые можно использовать в контексте данного изобретения, имеются в про-

даже под торговым наименованием "FluroTec®", доступным от West Pharmaceutical Services, Inc. (Лайонвилль, Пенсильвания). FluroTec® является примером фторуглеродного покрытия, используемого для минимизации или предотвращения прилипания лекарственного продукта к резиновой поверхности.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения фармацевтические препараты могут содержаться в шприце с низким содержанием вольфрама, который содержит поршень с фторуглеродным покрытием.

Фармацевтические составы могут вводиться субъекту парентеральными путями, такими как инъекция (например, подкожная, внутривенная, внутримышечная, внутривенная и т.д.) или чрескожное, слизистое, назальное, легочное или пероральное введение. Многочисленные многоразовые шприц-ручки или автоинъекционные устройства доставки могут быть использованы для подкожной доставки фармацевтических составов по данному описанию. Примеры включают в себя, но не ограничиваясь ими, AUTO-PEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейке, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия). Примеры одноразовых шприц-ручек или автоинъекционных устройств для доставки, которые используются для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному описанию, включают, но не ограничиваются ими, шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, LP) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Абботт Парк, Иллинойс).

Использование микроинфузора для доставки фармацевтических составов по данному описанию также рассматривается в данном документе. Используемый в данном документе термин "микроинфузор" означает устройство для подкожной доставки, предназначенное для медленного введения больших объемов (например, до около 2,5 мл или более) терапевтического состава в течение длительного периода времени (например, около 10, 15, 20, 25, 30 или более минут). См., например, патент США № 6629949; патент США № 6659982; и Meehan et al., J. Controlled Release, 46: 107-116 (1996). Микроинфузоры особенно полезны для доставки больших доз терапевтических белков, содержащихся в высоких концентрациях (например, около 100, 125, 150, 175, 200 или более мг/мл) или вязких растворах.

В одном варианте осуществления изобретения фармацевтический состав вводят через в/в капельницу, так что состав разводят в пакете для внутривенного вливания, содержащем физиологически приемлемый раствор. В одном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой составной стерильный препарат в пакете для внутривенного вливания, так что разовую дозу лекарственного продукта разводят в 100, 250 мл (или в другом подобном количестве, подходящем для внутривенной капельной доставки) физиологического буфера (например, 0,9% физиологического раствора). В некоторых вариантах осуществления изобретения инфузионный пакет изготовлен из поливинилхлорида (например, VIAFLEX, Baxter, Дирфилд, Иллинойс). В некоторых вариантах осуществления изобретения инфузионный пакет изготовлен из полиолефина (EXCEL IV Bags, Braun Medical Inc., Бетлехем, Пенсильвания).

Схемы введения.

Данное описание включает способы, включающие введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR, такой как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, с частотой дозирования около четырех раз в неделю, двух раз в неделю, одного раза в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в пять недель, раз в шесть недель, раз в восемь недель, раз в двенадцать недель или реже, пока достигается терапевтический ответ. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы включают введение фармацевтической композиции, содержащей антагонист APLNR, такой как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и антагонист VEGF, с частотой дозирования около четырех раз в неделю, дважды в неделю, раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в пять недель, раз в шесть недель, раз в восемь недель, раз в девять недель, раз в двенадцать недель или реже до тех пор, пока не достигается терапевтический ответ.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного описания, множественные дозы антагониста APLNR, такого как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающего фрагмента, и антагониста VEGF, могут вводиться субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с этим аспектом описания включают последовательное введение субъекту нескольких доз антагониста APLNR, такого как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и антагониста VEGF. Используемый в данном документе термин "последовательное введение" означает, что каждая доза антагониста APLNR, такого как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и антагониста VEGF, вводится субъекту в другой момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Данное описание включает способы,

которые включают в себя последовательное введение субъекту одной начальной дозы антагониста APLNR, такого как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающего фрагмента, и антагониста VEGF, с последующим введением одной или более вторичных доз антагониста APLNR, такого как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающего фрагмента, и антагониста VEGF, и необязательно сопровождаемые одной или более третичными дозами антагониста APLNR, такого как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающего фрагмента, и антагониста VEGF.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного описания, множественные дозы совместного состава, содержащего антагонист APLNR, такой как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и антагонист VEGF, могут вводиться субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с этим аспектом описания включают последовательное введение субъекту нескольких доз совместного состава, содержащего антагонист APLNR, такой как анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и антагонист VEGF. Используемый в данном документе термин "последовательное введение" означает, что каждая доза антагониста APLNR в комбинации с антагонистом VEGF вводится субъекту в другой момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Данное описание включает способы, которые включают в себя последовательное введение субъекту одной начальной дозы совместного состава, содержащего антагонист APLNR и антагонист VEGF, с последующей одной или более вторичными дозами совместного состава APLNR и антагониста VEGF, и необязательно с последующей одной или более третичными дозами совместного состава антагониста APLNR и антагониста VEGF.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемой "базовой дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество антагониста APLNR (или совместного состава, содержащего антагонист APLNR и антагонист VEGF), но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, однако, количество, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, корректируется вверх или вниз по мере необходимости) в течение курса лечения. В определенных вариантах осуществления изобретения, одну или более (например, 1, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения в виде "нагрузочных доз" с последующими дозами, которые вводят реже (например, "поддерживающие дозы"). Например, антагонист APLNR (или совместный состав, содержащий антагонист APLNR и антагонист VEGF) можно вводить субъекту с заболеванием глаз или расстройством при нагрузочной дозе около 6 мг с последующей одной или более поддерживающими дозами.

В одном иллюстративном варианте осуществления данного описания, каждая вторичная и/или третичная доза вводится от 1 до 14 (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2} или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", используемая в данном документе, означает в последовательности нескольких введений, дозу антагониста APLNR (или совместного состава, содержащего антагонист APLNR и антагонист VEGF), который вводят субъекту перед введением самой следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы согласно этому аспекту описания могут включать введение субъекту любого количества вторичных и/или третичных доз анти-APLNR антагониста (или совместного состава, содержащего антагонист APLNR и антагонист VEGF). Например, в определенных вариантах осуществления изобретения, субъекту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления изобретения субъекту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом, в определенных вариантах осуществления изобретения, субъекту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления изобретения субъекту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах осуществления изобретения, включающих множество вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться субъекту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления изобретения, включающих множественные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться субъекту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся субъекту, может изменяться в течение курса лечения. Частота введения может также регулироваться врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей отдельного субъекта после клинического обследования.

Данное описание включает способы, включающие последовательное введение антагониста APLNR и антагониста VEGF субъекту для лечения DME, AMD, ROP или PDR. В некоторых вариантах осуществления изобретения данные способы включают введение одной или более доз антагониста APLNR, а затем одной или более доз антагониста VEGF. В определенных вариантах осуществления изобретения,

данные способы включают введение одной дозы антагониста VEGF с последующей одной или более дозами антагониста APLNR.

Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получать и применять способы и композиции по данному описанию, и не предусмотрены для ограничения объема того, что авторы данного изобретения считают своим описанием. Были предприняты усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количествам, температуре и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, и давление находится на уровне или около атмосферного.

Пример 1.

Для оценки характеристик *in vivo* выбранных анти-APLNR антител по изобретению была измерена их способность блокировать APLNR-опосредованный ангиогенез в сосудистой сети глаза.

Модель развития сосудов сетчатки (RVD) была использована для оценки влияния антагонистического анти-APLNR антитела на разрастание кровеносных сосудов в нормально развивающейся сетчатке у детенышей, которые имели смешанный фоновый штамм (75% C57BL6 и 25% Sv129), и гомозиготные по экспрессии человеческого APLNR вместо мышинного APLNR (гуманизированные мыши APLNR).

Гуманизированным (Hu) АпельинР мышам системно (в/б) вводили 25 и 50 мг/кг антитела против рецептора апельина (α AR; H2aM9232N) в постнатальный день (P)2. Реагенты были замаскированы и помечены как раствор А и раствор В для предотвращения смещения экспериментатора. В постнатальный день 5 после образцы ткани собирали и затем фиксировали в ФСБ, содержащем 4% параформальдегид. Фиксированные образцы ткани (эндотелиальные клетки сетчатки) промывали ФСБ и затем окрашивали GS Lectin I (Vector Laboratories, #FL-1101), разведенным 1:200 в 1× ФСБ, содержащем 1% БСА в 0,25% Тритон-Х 100 в течение ночи при 25°C для визуализации сосудистой сети сетчатки. На следующий день окрашенные образцы несколько раз промывали ФСБ, плоско закрепляли на предметных стеклах, а затем накрывали покровными стеклами с использованием Prolong Gold (Invitrogen, #P36930). Изображения были получены с 20-кратным увеличением с использованием эпифлуоресцентного микроскопа (Nikon Eclipse 80). Сосудистые площади сетчатки измеряли по полученным изображениям, полученным в этом анализе, с использованием расширенной версии Adobe Photoshop CS6. Только после того как измерения площади сосудистой сети сетчатки и статистический анализ были завершены, идентификаторы выборки были незамаскированными.

На фиг. 1А и 1В представлены репрезентативные микрофотоснимки сетчатки мыши, обработанной системно при P2 до P5, и график рассчитанной сосудистой площади (изображения при 20×, для количественного определения и 40×; статистический анализ был выполнен с помощью Т-критерия Стьюдента).

Остаточная сосудистая площадь была значительно меньше в сетчатках α АпельинР (23% при 25 мг/кг, $p < 0,05$) по сравнению с необработанными сетчатками. Избирательное ингибирование АпельинР через системную инъекцию замедляло нормальное разрастание сосудов в развивающейся сетчатке у детенышей в P5. При дозе 25 мг/кг блокирование АпельинР слегка ингибирует разрастание сосудов.

Пример 2.

Последующий эксперимент в модели RVD был проведен аналогично примеру 1 при самой высокой дозе и проанализирован с помощью немаскированных идентификаторов. Вкратце, детенышам в/б вводили 50 мг/кг Fc (контроль) или α AR. Фиг. 2А и 2В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчатки мыши, обработанной системно в P2 до P5, и график рассчитанной сосудистой площади. Остаточная сосудистая площадь была значительно меньше в сетчатках α АпельинР (35% при 50 мг/кг, $p < 0,005$) по сравнению с необработанными сетчатками. Эндотелиальные клетки сетчатки были окрашены GS Lectin I. Изображения были получены при 20× (для количественного определения) и 40×. Статистический анализ проводился с использованием критерия Стьюдента. Избирательное ингибирование АпельинР через системную инъекцию замедляло нормальное разрастание сосудов в развивающейся сетчатке у детенышей в P5. Увеличивая дозу до 50 мг/кг, нацеливание на АпельинР дополнительно задерживает разрастание сосудов сетчатки.

Пример 3.

В последующем эксперименте на модели RVD (выполненном аналогично примеру 1) детенышам Hu в P2 вводили в/б 50 мг/кг Fc, α AR или афлиберцепта или комбинации (α AR и афлиберцепта) и собирали в P5. Фиг. 3А и 3В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчатки мыши, обработанной системно в P2 до P5, и график рассчитанной сосудистой площади. В этом слепом исследовании, 50 мг/кг α АпельинР снижали рост сосудов на 29,8% ($p < 0,0001$) по сравнению с обработанными Fc контролями. Эндотелиальные клетки сетчатки были окрашены GS Lectin I. Изображения были получены при 20× (для количественного определения) и 40×. Статистический анализ проводился с использованием критерия Стьюдента. Избирательное ингибирование АпельинР через системную инъекцию замедляет нормальное разрастание сосудов в развивающейся сетчатке у детенышей P5.

Пример 4.

В другом эксперименте на модели RVD (выполненном аналогично примеру 1), детенышам Нн в Р4 интравитреально (IVT) вводили 5 мкг Fc, α AR или афлиберцепта или комбинации (α AR и афлиберцепта) и собирали в Р6. Фиг. 4А и 4В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчатки мыши, обработанной системно в Р2 до Р5, и график рассчитанной сосудистой площади. Остаточная площадь сосудов была значительно меньше в комбинации (α АпелинР+афлиберцепт) (62% при 50 мг/кг, $p<0,0001$) по сравнению с отдельными реагентами, только α АпелинР (31% при 50 мг/кг, $p<0,001$) или афлиберцептом (43% при 50 мг/кг, $p<0,005$). Эндотелиальные клетки сетчатки окрашивали GS Lectin I. Обратите внимание на влияние на дозу и относительную площадь васкуляризации. Изображения были сделаны при 20 $\times$ (для количественного определения) и 40 $\times$. Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки. Как при системном, так и при интравитреальном введении (см. пример 5 ниже), комбинированная терапия α АпелинР и афлиберцептом приводила к регрессии нормально развивающейся сосудистой сети сетчатки. Блокирование как АпелинР, так и VEGFA посредством системной инъекции более эффективно для предотвращения разрастания сосудов по сравнению с блокированием только АпелинР или только VEGFA.

При введении α AR в Р2 разрастание сосудов было снижено на 23% ($n=6$ глаз/группы, $p<0,05$) при 25 мг/кг и на 35% ($n=6$ глаз/группа, $p<0,005$) при 50 мг/кг в Р5. В нашем исследовании с маскировкой удалось подтвердить наши наблюдения с 29% ($n=5$ глаз на группу, $p<0,0001$) уменьшением разрастания сосудов по сравнению с контролем Fc.

Комбинированное ингибирование АпелинР и VEGFA после в/б и IVT инъекций, значительно ограничивало разрастание сосудов на 62% при 50 мг/кг ($n=4$ глаза на группу, $p<0,0001$) и 68% при 5 мкг ($n=4$ глаза/группа, $p<0,0001$). Один только афлиберцепт вызывал снижение на 43% разрастания кровеносных сосудов при 50 мг/кг ($n=4$ глаза/группа, $p<0,001$) и снижение на 65% при 5 мкг ($n=3$ глаза/группа, $p<0,005$). Кроме того, один только α AR вызывал снижение на 31% разрастания кровеносных сосудов при 50 мг/кг ($n=4$ глаза/группа $p<0,001$) и снижение на 43% при 5 мкг ($n=4$ глаза/группа, $p<0,005$).

Пример 5.

В другом эксперименте с RVD мышам IVT вводили α АпелинР (H2aM9232N) (5 мкг), афлиберцепт (5 мкг) или комбинацию (примесь) α АпелинР и афлиберцепта. Фиг. 5А и 5В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчатки мыши, обработанной интравитреально инъекцией в Р4 до Р6, и график рассчитанной сосудистой площади. Остаточная площадь сосудов была значительно меньше в комбинации (α АпелинР+афлиберцепт) (68% при 5 мкг/кг, $p<0,0001$) по сравнению с отдельными реагентами, только α АпелинР (43% при 5 мкг/кг, $p<0,0001$) или афлиберцептом (65% при 5 мкг/кг, $p<0,0001$). Обратите внимание на влияние на дозу и реляционную васкуляризованную площадь. Изображения были сделаны при 20 $\times$ (для количественного определения) и 40 $\times$. Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки. Как при системном, так и при интравитреальном введении введение α АпелинР и афлиберцепта приводит к регрессии нормально развивающейся сосудистой сети сетчатки. Блокирование как АпелинР, так и VEGFA с помощью интравитреальной инъекции еще более эффективно для предотвращения роста сосудов по сравнению с блокированием только АпелинР и VEGFA.

Пример 6.

Мышиная модель кислородно-индуцированной ишемической ретинопатии (OIR) является хорошо охарактеризованной моделью патологической неоваскуляризации, связанной с повышенной экспрессией важного проангиогенного фактора, VEGF (Smith et al., 1994, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 35: 101-111; Neely et al., 1998, Am. J. Pathol., 153: 665-670; Saint-Geniez et al., 2004, Int. J. Dev. Biol., 48:1045-1058) и, таким образом, имеют отношение к патологическому ангиогенезу, связанному с различными заболеваниями (Ferrara et al., 2005, Nature, 438: 967-974).

Было проведено исследование для определения влияния анти-APLNR антитела на рост сосуда сетчатки, образование сосудистых аномалий и перфузию сетчатки при кислородно-индуцированной ишемической ретинопатии (OIR).

Чтобы определить, играет ли сигналинг апелина/APLNR роль в патологическом ангиогенезе, а также во время нормального развития, была использована модель OIR. В модели OIR, воздействие на детенышей гипероксии в Р6 приводит к быстрой облитерации капилляров в центральной сетчатке. После возвращения к комнатному воздуху в Р11 бессосудистая зона становится сильно гипоксической, что, в свою очередь, вызывает обширную аномальную неоваскуляризацию, характеризующуюся эктопическим ростом сосудов в стекловидное тело (эпиретинальные сосудистые "пучки") и образованием аномальных артериовенозных шунтов; центральные части сетчатки остаются в основном бессосудистыми в течение длительного периода.

Мышей C57/B16 (Taconic) использовали для изучения влияния ловушки VEGF или нейтрализующего антитела к APLNR на неоваскуляризацию сетчатки в OIR. OIR был произведен по способу, разработанному Smith et al., 1994 (выше). Вкратце, гуманизированных детенышей мыши помещали в гипероксическую среду (75% O₂) в Р6 и возвращали в комнатный воздух в Р11. Воздействие гипероксии вызыва-

ет быструю вазооблитерацию в центральной сетчатке. Когда мышей возвращают в комнатный воздух (P11), потеря сосудов из центральной сетчатки приводит к тяжелой гипоксии/ишемии, которая, в свою очередь, стимулирует патологические сосудистые изменения. Детенышам системно вводили 50 мг/кг Fc (контроль), α -АпелинР или афлиберцепта в P12 и собирали в P16. Эндотелиальные клетки сетчатки окрашивали GS Lectin I.

Фиг. 6А и 6В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчаток глаза мыши OIR, обработанных системно в P12 до P16, и графики рассчитанной аваскулярной площади. Остаточная аваскулярная площадь была значительно меньше в сетчатке α -АпелинР (29%, $p < 0,05$) и афлиберцепта (27,5%, $p < 0,01$) по сравнению с сетчаткой Fc (контроль). Обратите внимание на значительное уменьшение неоваскулярных пучков в образцах, обработанных α -АпелинР (67%, $p < 0,0001$) и афлиберцептом (94%, $p < 0,0005$), по сравнению с Fc. Эндотелиальные клетки сетчатки были окрашены GS Lectin I. Изображения были получены при 20 $\times$ (количественное определение аваскулярной площади) и 40 $\times$ (количественное определение аномальной неоваскулярной площади). Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки. Как при системном, так и при интравитреальном введении селективное ингибирование АпелинР способствует отращанию сосудов сетчатки и уменьшает неоваскуляризацию у мышей OIR. Ингибирование АпелинР и VEGFA с помощью системной инъекции способствует отращанию сосудов сетчатки и уменьшает патологическую неоваскуляризацию.

Мышей OIR. обрабатывали аналогично вышеуказанному исследованию, за исключением того, что мышам OIR IVT инъецировали с 5 мкг Fc, α AR или афлиберцепта в P12 и собирали в P16. На фиг. 7А и 7В представлены репрезентативные микрофотографии сетчатки глаза мыши OIR, обработанной интравитреально в P12 до P16, и графики рассчитанной аваскулярной площади. Аваскулярная площадь была значительно уменьшена в условиях α -АпелинР (27,5% $p < 0,05$) и увеличена в условиях афлиберцепта (32%, $p < 0,0001$) по сравнению с Fc контролями. Обратите внимание на значительное уменьшение неоваскулярных пучков в α -АпелинР (60%, $p < 0,0001$) и полное исчезновение пучков в образцах афлиберцепта. Эндотелиальные клетки сетчатки были окрашены GS Lectin I. Изображения были получены при 20 $\times$ (количественное определение аваскулярной площади) и 40 $\times$ (количественное определение аномальной неоваскулярной площади). Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки. Как при системном, так и при интравитреальном введении селективное ингибирование АпелинР способствует отращанию сосудов сетчатки и уменьшает неоваскуляризацию у мышей OIR. Ингибирование АпелинР посредством интравитреальной инъекции улучшает отращание сосудов и уменьшает аномальные неоваскуляризации, тогда как ингибирование VEGFA останавливает отращание сосудов и полностью останавливает любые неоваскуляризации.

В модели OIR, α AR и афлиберцепт были способны способствовать отращанию сосудов. Когда детенышам в/б вводили OIR в P12, α AR и афлиберцепт значительно уменьшали аваскулярные площади на 29 и 27% ($n=6$ глаз/группа, $p < 0,05$) и неоваскуляризацию на 69 и 94% ($n=6$ глаз/группа, $p < 0,0001$) в P16, соответственно. При IVT введении афлиберцепт уменьшал отращание сосудов на 30% ($n=4$ глаза/группу, $p < 0,0001$) и устранял всю неоваскуляризацию, тогда как α AR был способен стимулировать отращание сосудов на 30% ($n=4$ глаза/группа, $p < 0,05$) и уменьшать неоваскуляризацию на 60% ($n=4$ глаза/группа, $p < 0,0001$).

Комбинация антагониста APLNR и ловушки VEGF, например, афлиберцепт, также регрессировала патологический ангиогенез и способствовал нормальному отращанию сосудов в модели OIR, как обсуждалось в примере 7. Поэтому ожидается, что эта комбинация будет лечить патологический ангиогенез, наблюдаемый при различных заболеваниях глаз, включая ретинопатию недоношенных.

Пример 7.

В следующем эксперименте *in vivo* модель OIR, как обсуждалось выше в примере 6, использовалась для оценки организации и плотности реваскуляризации. Вкратце, гуманизированных детенышей мыши помещали в гипероксическую среду (75% O₂) в P6 и возвращали в комнатный воздух в P11. Воздействие гипероксии вызывает быструю вазооблитерацию в центральной сетчатке. Когда мышей возвращают в комнатный воздух (P11), потеря сосудов из центральной сетчатки приводит к тяжелой гипоксии/ишемии, которая, в свою очередь, стимулирует патологические сосудистые изменения. Детенышам системно вводили 50 мг/кг Fc (контроль), α APLNR (H4N9232N) или афлиберцепта (VEGF-ловушка) или 25 мг/кг комбинации α APLNR и афлиберцепта в P12 и собирали в P16. Эндотелиальные клетки сетчатки окрашивали GS Lectin I.

Фиг. 8А и 8В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчаток глаза мыши OIR, обработанных системно (20 $\times$) в P12 до P16, и графики рассчитанной аваскулярной площади. Скорость отращания при комбинированном лечении аналогична каждому отдельному агенту, и с этой целью, отращание сосудов улучшается во всех условиях лечения по сравнению с контрольными сетчатками, обработанными hFc, при комбинированном лечении, демонстрирующем немного более низкую среднюю аваскулярную площадь. Фиг. 8В демонстрирует, что были значительные изменения в аваскулярной площади между группами лечения ($p < 0,0005$). Площадь сосуда была значительно уменьшена с анти-APLNR антителом (**, $p < 0,05$), с VEGF ловушкой (***, $p < 0,005$) и с комбинацией (***, $p < 0,05$) по сравнению с

контролем Fc. Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки.

Фиг. 9А и 9В представляют собой репрезентативные микрофотографии сетчаток глаза мыши OIR, обработанных системно (40×) в P12 до P16, и графики рассчитанной аномальной сосудистой площади. Комбинированное лечение показывает меньшее количество обрезанных сосудов по сравнению с VEGF ловушкой и меньшее количество аномальных неоваскуляризаций по сравнению с анти-APLNR и Fc контролем (фиг. 9А). Фиг. 9В демонстрирует, что были значительные изменения в аномальной сосудистой площади между группами лечения ($p < 0,0005$). Аномальная сосудистая площадь была значительно уменьшена с анти-APLNR (***, $p < 0,0005$), с VEGF ловушкой (***, $p < 0,005$) и с комбинацией (***, $p < 0,0005$) по сравнению с контролем Fc. Аномальная сосудистая площадь была также значительно уменьшена в группе комбинированного лечения (*, $p < 0,05$) по сравнению с группой лечения анти-APLNR. Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки.

На фиг. 10 представлены примеры обработки и измерения изображения, используемые для расчета площади сосуда и длины сосуда. "Исходные изображения" - это 40× микрофотографии, показанные на фиг. 9А. "Пороговые изображения" и "двоичные изображения" обсуждаются более конкретно со ссылкой на фиг. 11А, 11В, 12А и 12В ниже.

Фиг. 11А и 11В представляют репрезентативные обработанные изображения, показывающие организацию и однородность сосудов с микрофотографий (40×) сетчаток глаза мыши OIR, обработанных системно в P12 до P16, и графики рассчитанной площади сосуда. Как продемонстрировано на фиг. 11А, комбинация анти-APLNR антитела и VEGF ловушки приводила к образованию сосудов сетчатки, которые более организованы и однородны по сравнению только с анти-APLNR, и менее разреженными (с меньшим количеством обрезанных сосудов) по сравнению только с VEGF ловушкой. Фиг. 11В демонстрирует, что были значительные изменения в площади сосудов между группами лечения ($p < 0,0005$). Площадь сосудов была значительно увеличена с анти-APLNR (***, $p < 0,0005$) и уменьшена с VEGF ловушкой (***, $p < 0,005$) и комбинированной терапией (*, $p < 0,05$) по сравнению с Fc контролем. Площадь сосудов была значительно уменьшена с VEGF ловушкой (####, $p < 0,0005$) и с комбинацией (####, $p < 0,0005$) по сравнению с анти-APLNR. В отличие от этого, площадь сосудов была значительно увеличена при комбинированной терапии (&&&, $p < 0,005$) по сравнению с VEGF ловушкой. Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки.

Фиг. 12А и 12В представляют репрезентативные обработанные изображения, показывающие плотность сосудов с микрофотографий (40×) сетчаток глаза мыши OIR, обработанных системно в P12 до P16, и графики рассчитанной длины сосуда. Как показано на фиг. 12А, комбинация анти-APLNR антитела и VEGF ловушки продуцировала сосуды сетчатки промежуточной плотности по сравнению с анти-APLNR (более высокой плотностью) или только с VEGF ловушкой (меньшей плотностью). Фиг. 12В демонстрирует, что были значительные изменения в длине сосуда между группами лечения ($p < 0,0005$). Длина сосудов была значительно уменьшена с VEGF ловушкой (####, $p < 0,0005$) и с комбинацией (####, $p < 0,0005$) по сравнению с анти-APLNR. В отличие от этого, длина сосудов была значительно увеличена при комбинированной терапии (&&&, $p < 0,005$) по сравнению с VEGF ловушкой. Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки.

Как продемонстрировано на фиг. 8А-12В и обсуждено выше, комбинация анти-APLNR антитела и VEGF ловушки способствует реваскуляризации, приводя к уменьшению аваскулярной площади по сравнению с контролями Fc. Кроме того, комбинированное лечение ингибирует патологическую неоваскуляризацию и оказывает промежуточный эффект на площадь сосуда и длину сосуда по сравнению с лечением анти-APLNR антителом или только VEGF ловушкой. В частности, комбинированное лечение способствует росту микрососудов между основными кровеносными сосудами по сравнению с лечением VEGF ловушкой, и улучшает организацию и однородность кровеносных сосудов по сравнению с лечением анти-APLNR антителами.

Данное описание не предполагает ограничение объема конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно различные модификации данного описания в дополнение к таковым, описанным в данном документе, станут очевидными специалистам в данной области техники из предшествующего описания и прилагаемых фигур. Такие модификации предусмотрены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения сосудистого заболевания глаз или сосудистого расстройства глаз, включающий введение терапевтически эффективного количества антагониста APLNR пациенту, где антагонист APLNR представляет собой анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с APLNR человека и содержат шесть областей, определяющих комплементарность, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 19, 20 и 21 соответственно; и введение терапевтически эффективного количества антагониста фактора роста эндотелия сосудов

(VEGF) пациенту, где антагонист VEGF представляет собой афлиберцепт.

2. Способ по п.1, где пациенту был поставлен диагноз заболевание или расстройство глаз, которые выбраны из группы, состоящей из диабетической ретинопатии, пролиферативной диабетической ретинопатии, диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскуляризации сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, окклюзии разветвленной вены сетчатки, полипозной хориоидальной васкулопатии, хориоидальной неоваскуляризации (CNV), дегенеративной миопии (миопическая CNV), неоваскулярной глаукомы и ретинопатии недоношенных.

3. Способ по п.2, где заболевание или расстройство глаз представляет собой возрастную макулярную дегенерацию.

4. Способ по п.2, где заболевание или расстройство глаз представляет собой диабетический макулярный отек.

5. Способ по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и

переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

6. Способ по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека с константным участком тяжелой цепи IgG1 или IgG4.

7. Композиция для лечения сосудистого заболевания или сосудистого расстройства глаз, содержащая

терапевтически эффективное количество антагониста APLNR, где антагонист APLNR представляет собой анти-APLNR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с APLNR человека и содержат шесть областей, определяющих комплементарность, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 19, 20 и 21 соответственно;

терапевтически эффективное количество антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), где антагонист VEGF представляет собой афлиберцепт; и

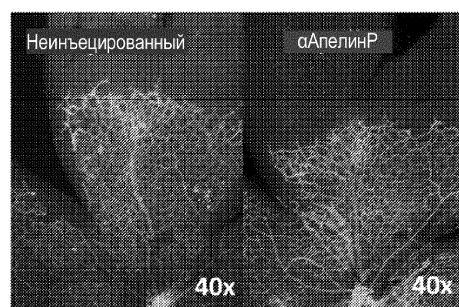
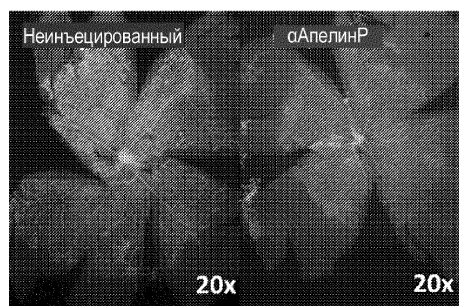
подходящий носитель, эксципиент или разбавитель.

8. Композиция по п.7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и

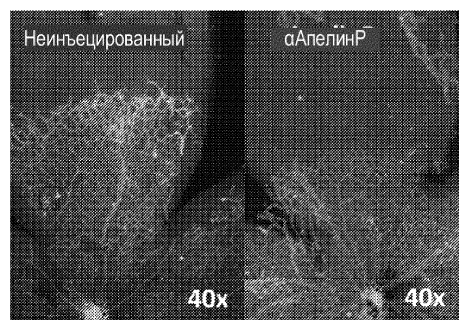
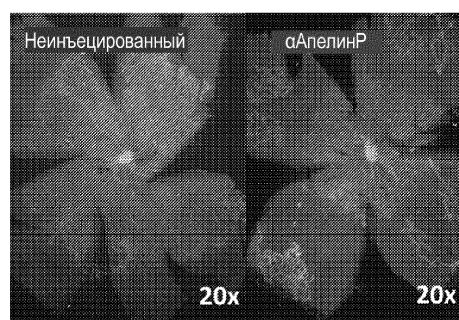
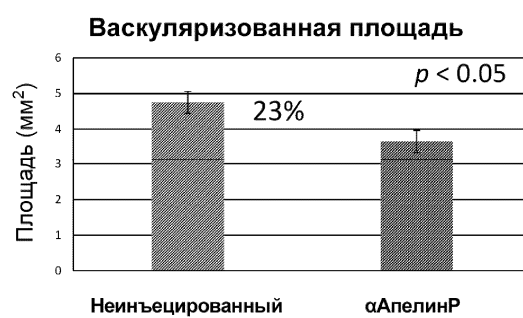
переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

9. Композиция по п.7 или 8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека с константным участком тяжелой цепи IgG1 или IgG4.

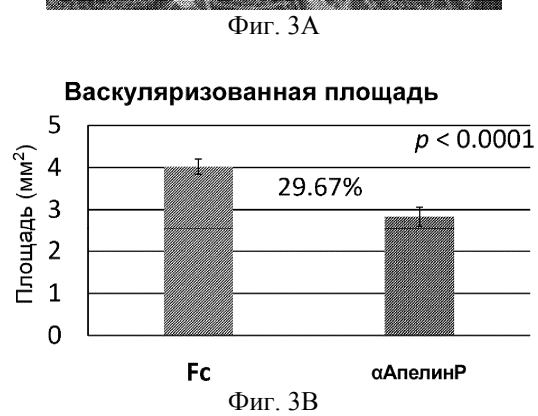
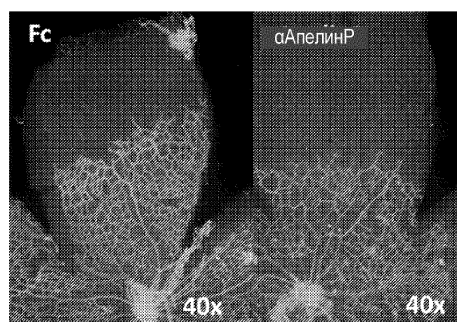
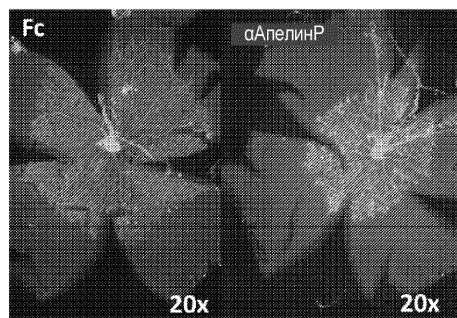
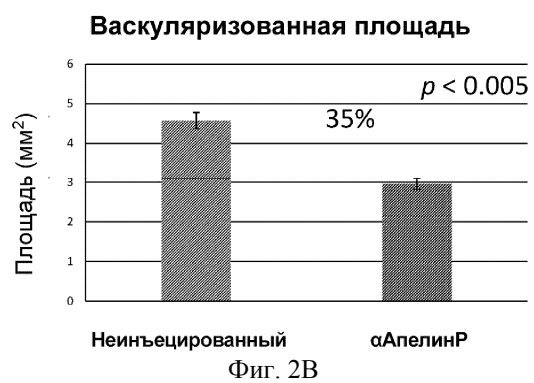
10. Композиция по любому из пп.7-9, где заболевание или расстройство глаз выбрано из группы, состоящей из диабетической ретинопатии, пролиферативной диабетической ретинопатии, диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскуляризации сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, окклюзии разветвленной вены сетчатки, полипозной хориоидальной васкулопатии, хориоидальной неоваскуляризации (CNV), дегенеративной миопии (миопическая CNV), неоваскулярной глаукомы и ретинопатии недоношенных.

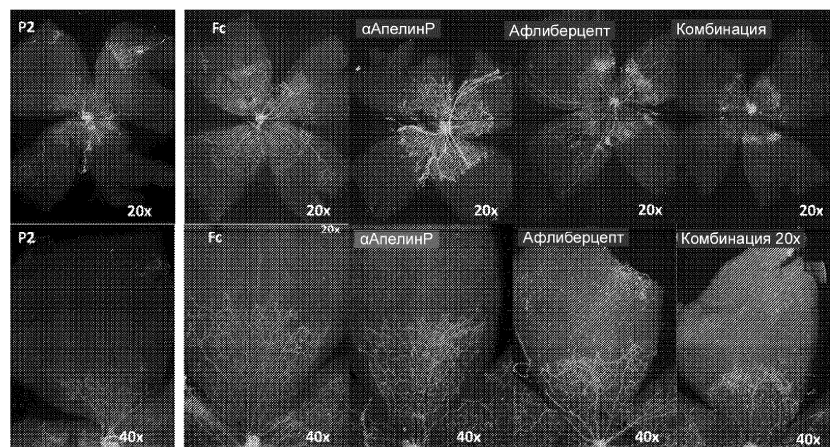


Фиг. 1А

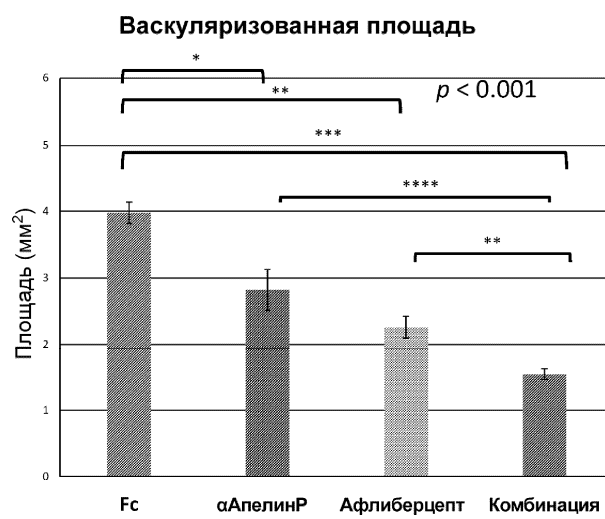


Фиг. 2А

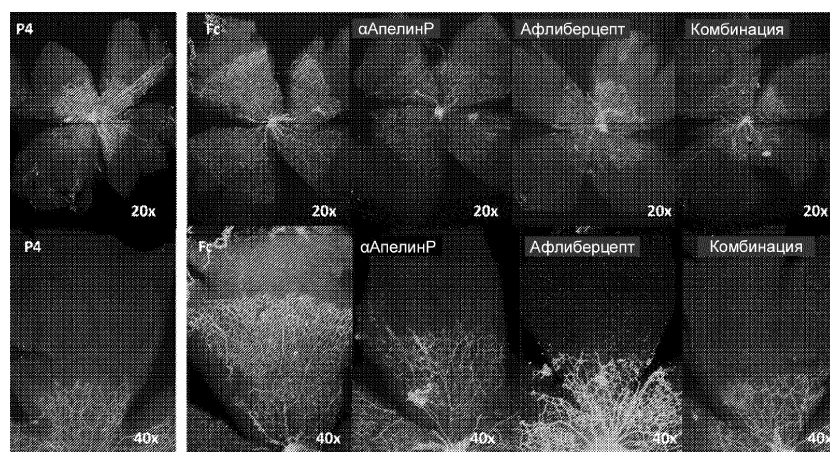




Фиг. 4А

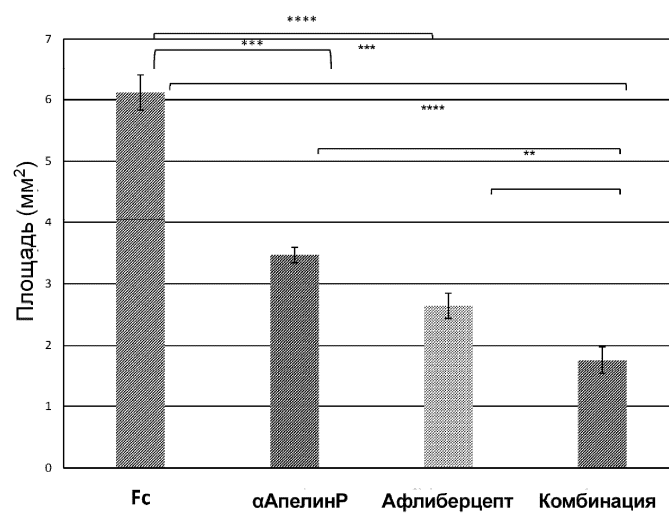


Фиг. 4В

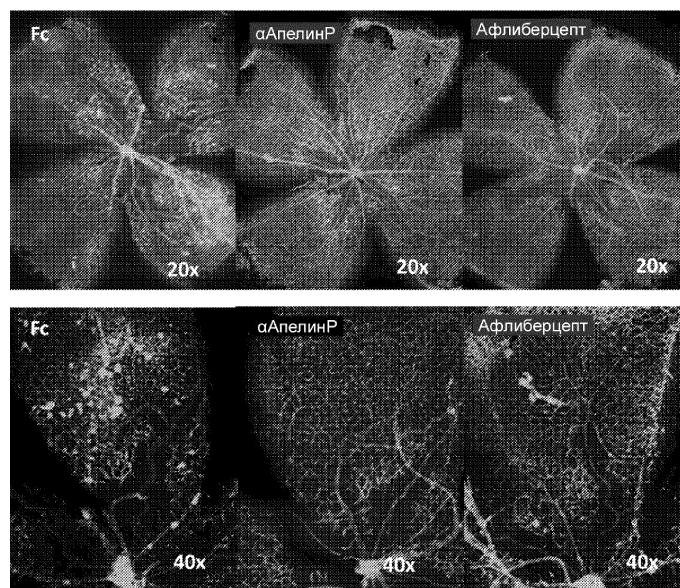


Фиг. 5А

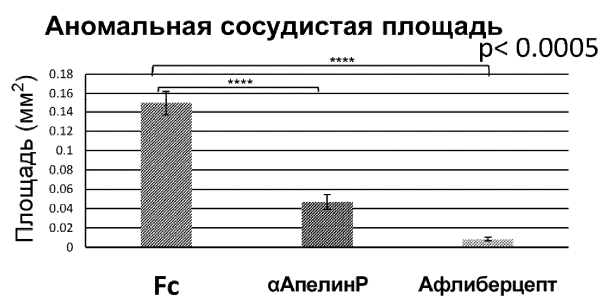
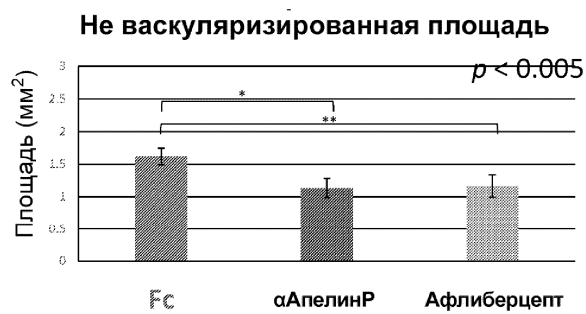
Васкуляризованная площадь $p < 0.0005$



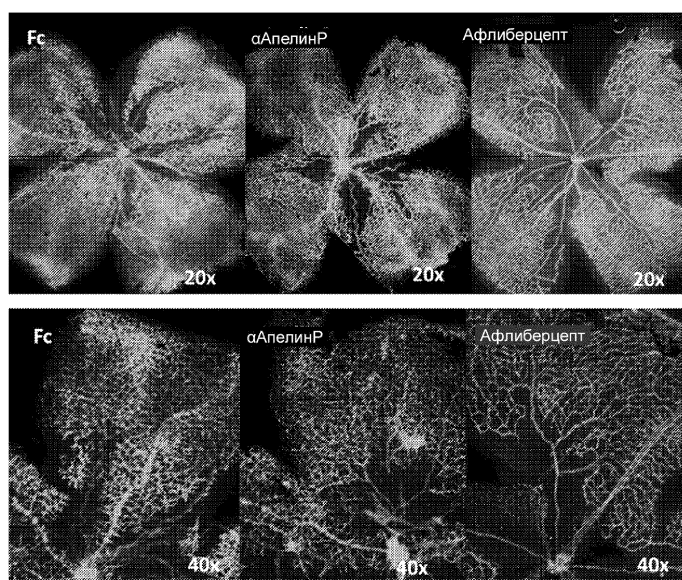
Фиг. 5В



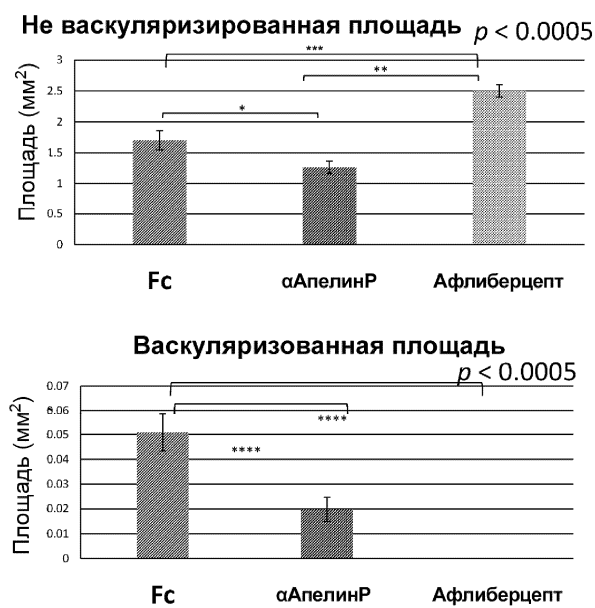
Фиг. 6А



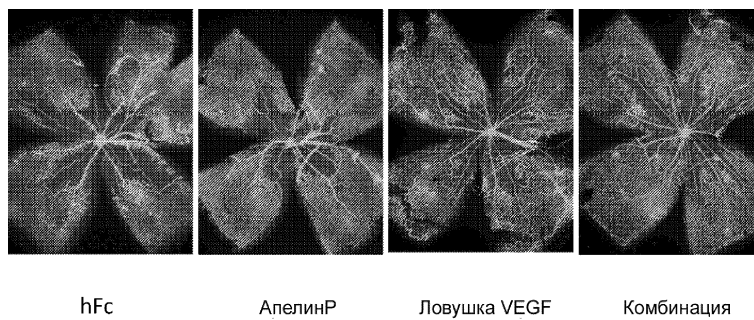
Фиг. 6В



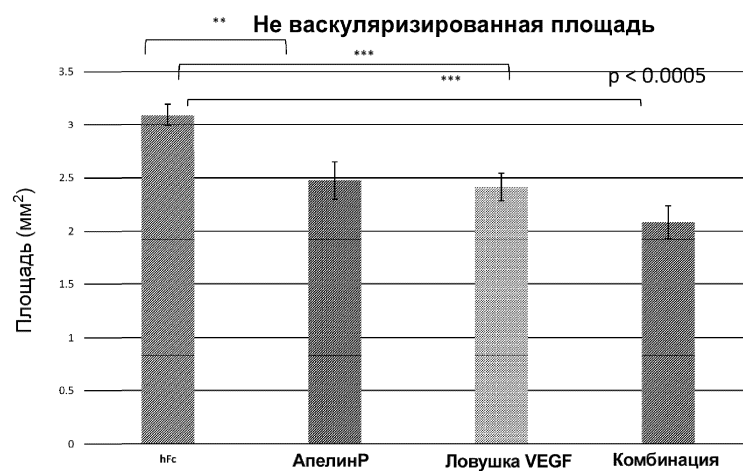
Фиг. 7А



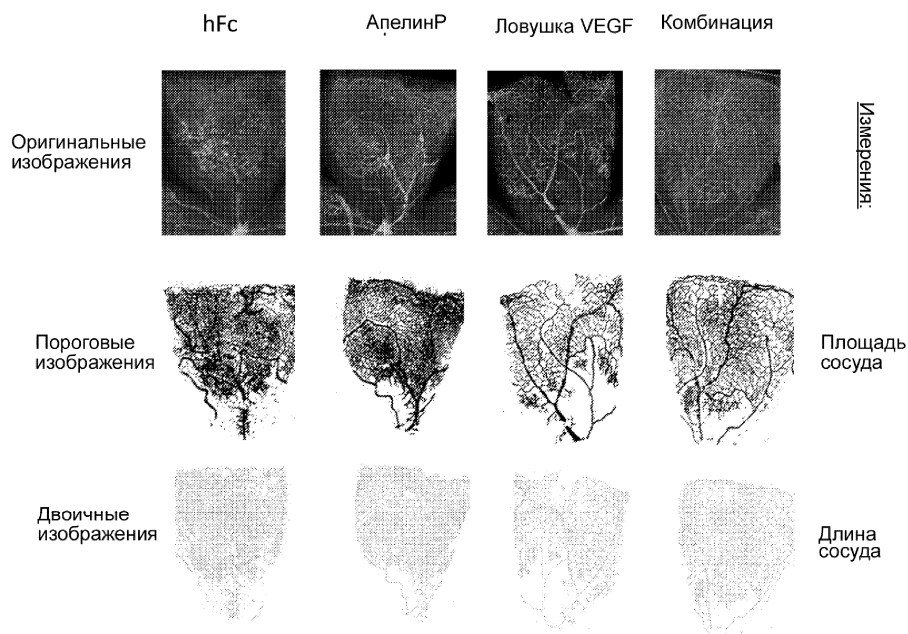
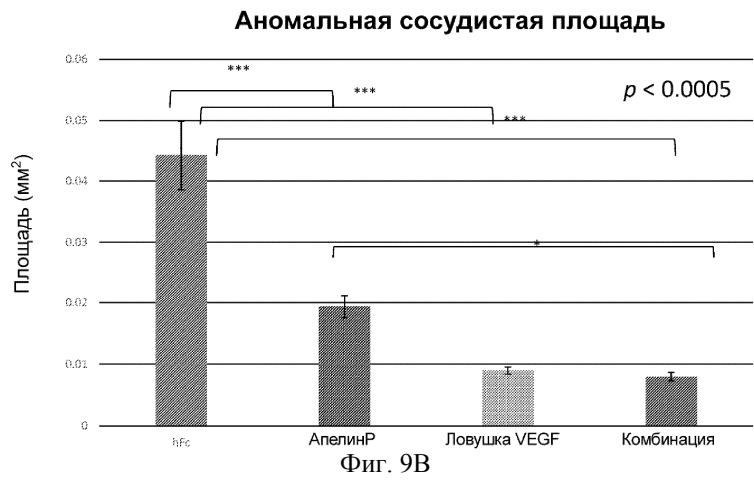
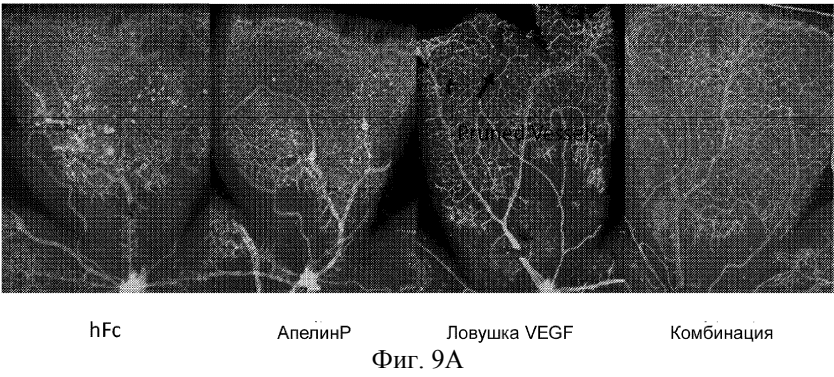
Фиг. 7В



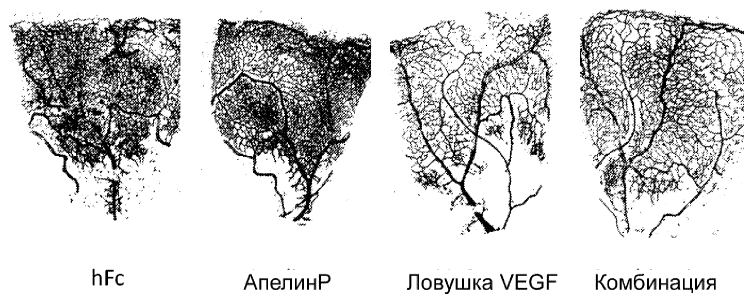
Фиг. 8А



Фиг. 8В

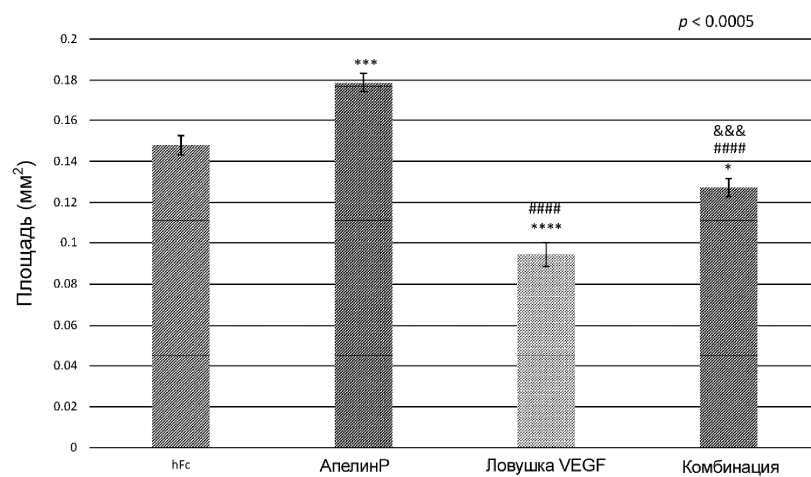


Фиг. 10

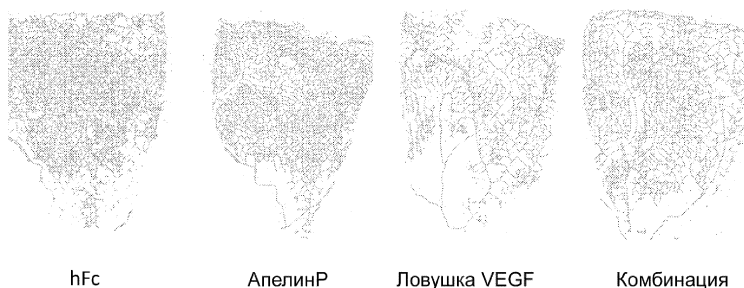


Фиг. 11А

Площадь сосуда

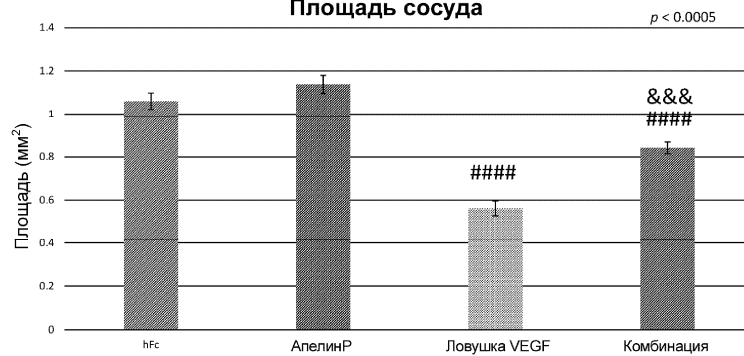


Фиг. 11В



Фиг. 12А

Площадь сосуда



Фиг. 12В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2