

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392118** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.11.23

(51) Int. Cl. *C07K 16/22* (2006.01)  
*A61P 11/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.01.25

---

(54) **АНТИТЕЛА К PDGF-B И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕГОЧНОЙ  
АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ (РАН)**

---

(31) 63/141,030

(32) 2021.01.25

(33) US

(86) PCT/US2022/013666

(87) WO 2022/159875 2022.07.28

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН**

**ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Гао Инлинь, Макдоннелл Скотт,**

**Сундарам Бхаратхи, Ким Чи, Дель**

**Приоре Изабелла, Мегна Джейк,**

**Жуань Цинь (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Данное описание относится к антителам к субъединице В тромбоцитарного фактора роста (PDGF-B) и их антигенсвязывающим фрагментам, а также способам применения таких антител или их антигенсвязывающих фрагментов для лечения пациента, у которого наблюдается легочная артериальная гипертензия (РАН).

---

**A1**

**202392118**

**202392118**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578762EA/019

### АНТИТЕЛА К PDGF-B И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ (РАН)

#### РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Настоящая заявка заявляет приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 63/141,030, поданной 25 января 2021 года, содержание которой включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[001.1] Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и настоящим включенный в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Указанная ASCII-копия, созданная 20 января 2022 года, имеет название 118003-00720\_SL.txt, и ее размер составляет 33624 байта.

#### ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[002] Данное изобретение относится к антителам человека и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с субъединицей В тромбоцитарного фактора роста (PDGF-B), и к терапевтическим и диагностическим способам применения таких антител и фрагментов.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Тромбоцитарные факторы роста (PDGF) являются сильными митогенами, которые существуют в виде пяти разных димерных конфигураций, состоящих из четырех разных субъединиц, являющихся изоформами: А, В, С и D. Пять димерных форм PDGF представляют собой AA, BB, AB, CC и DD, которые образованы посредством дисульфидной связи соответствующих отдельных мономеров PDGF. Лиганды PDGF проявляют свои биологические эффекты посредством взаимодействий с рецепторами PDGF (PDGFR). PDGFR являются трансмембранными тирозинкиназными рецепторами, которые пересекают мембрану один раз, состоящими из гетеродимерных или гомодимерных ассоциаций цепи альфа ( $\alpha$ ) рецептора (PDGFR-альфа) и/или цепи бета ( $\beta$ ) рецептора (PDGF-B). Таким образом, активные PDGFR могут состоять из пар цепей рецептора  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  или  $\alpha\beta$ . PDGFR имеют общую доменную структуру, включающую пять внеклеточных иммуноглобулиновых (Ig) петель, трансмембранный домен и расщепленный внутриклеточный тирозинкиназный (ТК) домен. Взаимодействие между димерными PDGF-лигандами и PDGFR приводит к димеризации цепей рецептора, аутофосфорилированию рецептора и внутриклеточной сигнальной трансдукции. Было продемонстрировано *in vitro*, что  $\beta\beta$ -рецепторы активируются PDGF-BB и -DD, тогда как  $\alpha\beta$ -рецепторы активируются PDGF-BB, -CC, -DD и -AB, и  $\alpha\alpha$ -рецепторы активируются PDGF-AA, -BB, -CC и -AB (см. Andrae *et al.* (2008) Genes Dev 22(10): 1276-1312).

[004] Передача сигналов с участием PDGF вовлечена в развитие различных заболеваний человека, включая легочную артериальную гипертензию (РАН). Легочная артериальная гипертензия (РАН) представляет собой прогрессирующее нарушение,

характеризующееся устойчивым повышением давления в легочных артериях, которое приводит к поражению как больших, так и малых легочных артерий. РАН определяется гемодинамически как систолическое давление в легочной артерии более 30 мм рт. ст или оценка среднего давления в легочной артерии более 25 мм рт. ст при давлении в легочных капиллярах или левом предсердии равном или менее 15 мм рт. ст. См., например, *Zaiman et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33:425-31 (2005). Стойкая вазоконстрикция при РАН приводит к структурному ремоделированию, в ходе которого гладкомышечные клетки и эндотелиальные клетки легочных сосудов подвергаются фенотипическому переключению с сократительного нормального фенотипа на синтетический фенотип, что приводит к росту клеток и отложению матрикса. Поскольку стенки мельчайших кровеносных сосудов утолщаются, они менее способны нормально переносить кислород и углекислый газ между кровью и легкими, и со временем легочная гипертензия приводит к утолщению легочных артерий и сужению проходов, по которым течет кровь. В конечном итоге пролиферация гладкомышечных и эндотелиальных клеток сосудов приводит к ремоделированию сосудов с облитерацией просвета легочной сосудистой системы. Гистологическое исследование образцов тканей пациентов с легочной гипертензией показывает утолщение интимы, а также гипертрофию гладкомышечных клеток, особенно сосудов диаметром <100 мкм. Это вызывает прогрессирующее повышение легочного давления, поскольку кровь прокачивается через уменьшенную площадь просвета. Как следствие, правая сторона сердца работает больше для компенсации, и повышенное усилие приводит к увеличению и утолщению правого желудочка. Увеличенный правый желудочек подвергает человека риску легочной эмболии, поскольку кровь имеет тенденцию скапливаться в желудочке и в ногах. Если в скопившейся крови образуются сгустки, они могут в конечном итоге перемещаться и застревать в легких. В конце концов, дополнительная нагрузка на правый желудочек приводит к отказу работы сердца и преждевременной смерти таких пациентов.

[005] Стандартные варианты терапии для лечения пациентов с РАН в первую очередь гемодинамические, влияющие на тонус сосудов, и включают, например, аналоги простаглицлина, антагонисты рецепторов эндотелина, ингибиторы фосфодиэстеразы и активаторы/стимуляторы растворимой гуанилатциклазы, которые обеспечивают облегчение симптомов и улучшают прогноз. Однако, эти варианты терапии не обеспечивают достижения результата и не восстанавливают структурную и функциональную целостность легочной сосудистой системы, чтобы обеспечить пациенту с РАН долгосрочную выживаемость без инвалидности.

[006] Несмотря на все достижения в терапии РАН, предполагаемые кандидаты для излечения этого смертельного заболевания пока отсутствуют, и у большинства пациентов продолжается прогрессирование недостаточности правого желудочка. Таким образом, в данной области техники существует потребность в новых высокоспецифичных и сильных ингибиторах передачи сигналов с участием PDGF.

#### *СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ*

[007] Данное описание относится к полностью человеческим моноклональным

антителам (mAb) и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с субъединицей В тромбоцитарного фактора роста (PDGF-B). Такие антитела могут быть пригодны для лечения пациента с легочной артериальной гипертензией (PAH).

[008] Уровень циркулирующего и экспрессирующегося в легких PDGF-B, сильного митогена для гладкомышечных клеток и фибробластов легких, повышен как у пациентов, у которых наблюдается идиопатическая PAH, так и в мышинной модели PAH, индуцированной гипоксией/Sugen. Взаимодействия PDGF-B с PDGFR $\beta\beta$ , PDGFR $\alpha\beta$  и PDGFR $\alpha\alpha$  вовлечены в стимуляцию патологической васкуляризации и ремоделирования легочных сосудов. Соответственно, нацеливание на PDGF-B обеспечивает повышенную эффективность, не затрагивая PDGFR $\beta$ , за счет нацеливания на передачу сигналов через PDGFR $\alpha\alpha$ , PDGFR $\alpha\beta$  и PDGFR $\beta\beta$ , которые функционируют вместе, стимулируя аномальное ремоделирование сосудов.

[009] Соответственно, в одном аспекте, данное описание относится к выделенному моноклональному антителу человека или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с субъединицей В тромбоцитарного фактора роста (PDGF-B) человека.

[010] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент проявляют одно или несколько свойств, выбранных из группы, состоящей из следующего: (а) связываются с гомодимером субъединицы В PDGF человека (PDGF-BB) при 37°C с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) менее чем около 1,84 пМ, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса; (b) связываются с PDGF-BB человека при 37°C с  $K_D$  менее чем около 1,36 пМ, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса; (с) связываются с PDGF-BB человека при 37°C с  $t_{1/2}$ , превышающим или равным около 1155 минут, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса; (d) связываются с PDGF-BB человека при 25°C с  $K_D$  менее чем около 2,79 пМ, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса; (е) связываются с PDGF-BB человека при 25°C с  $t_{1/2}$ , превышающим или равным около 1155 минутам, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса; (f) ингибируют активацию PDGF-B в отношении PDGF-BB человека с  $IC_{50}$  менее чем около 1,9 нМ, как измерено в конкурентном ELISA-анализе при 25 °C; (g) ингибируют активацию PDGF-B в отношении гетеродимера субъединицы А и субъединицы В PDGF (PDGF-AB) человека с  $IC_{50}$  менее чем около 8,8 нМ, как измерено в конкурентном ELISA-анализе при 25 °C; и (h) блокируют взаимодействие между PDGF-BB человека и одним или несколькими PDGFR- $\alpha\alpha$ , PDGFR- $\alpha\beta$  и PDGFR- $\beta\beta$  человека.

[011] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарности области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3),

содержащиеся в пределах любой из последовательностей вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

[012] В некоторых вариантах реализации изобретения выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с последовательностью SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:22.

[013] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с последовательностью SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:30.

[014] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат: (a) HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22; и (b) LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

[015] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат: (a) HCDR1-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 24; (b) HCDR2-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 26; (c) HCDR3-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 28; (d) LCDR1-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 32; (e) LCDR2-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 34; и/или (f) LCDR3-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 36.

[016] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 и 22/30.

[017] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат (i) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18; и/или (ii) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40, и тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38.

[018] В некоторых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, молекулу одноцепочечного Fv (scFv) или dAb-фрагмент.

[019] В другом аспекте, данное описание относится к выделенному антителу или его

антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают тот же эпитоп на PDGF-B человека, что и антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, содержащее три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

[020] В другом аспекте, данное описание относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые конкурируют за связывание с PDGF-B человека с антителом, или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

[021] В другом аспекте, данное изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела к PDGF или их фрагменты. Рекомбинантные векторы экспрессии, несущие нуклеиновые кислоты по данному изобретению, и клетки-хозяева, в которые такие векторы были введены, также охватываются данным изобретением, как и способы получения антител путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих возможность продукции антител, и извлечения продуцированных антител.

[022] В другом аспекте, данное описание относится к способу получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, при этом способ включает: (i) введение одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих легкую иммуноглобулиновую цепь указанных антитела или фрагмента, и тяжелую иммуноглобулиновую цепь указанных антитела или фрагмента, в клетку-хозяина; (ii) культивирование клетки-хозяина в питательной среде в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида(полинуклеотидов); и (iii) необязательно, выделение антитела или фрагмента из клетки-хозяина и/или среды, в которой растет клетка-хозяин.

[023] В другом аспекте, данное описание относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, продуцируемым с помощью способа, включающего: (i) введение одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих легкую иммуноглобулиновую цепь указанных антитела или фрагмента, и тяжелую иммуноглобулиновую цепь указанных антитела или фрагмента, в клетку-хозяина; (ii) культивирование клетки-хозяина в питательной среде в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида(полинуклеотидов); и (iii) необязательно, выделение антитела или фрагмента из клетки-хозяина и/или среды, в которой растет клетка-хозяин.

[024] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

[025] В другом аспекте, данное описание относится к устройству для инъекций или сосуду, содержащим антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе.

[026] В другом аспекте, данное описание относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PDGF-B человека, как описано выше или описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель; и необязательно одно или несколько дополнительных терапевтических средств.

[027] В некоторых вариантах реализации изобретения одно или несколько дополнительных терапевтических средств включают пищевую добавку, содержащую железо.

[028] В другом аспекте, данное описание относится к способу предупреждения или лечения легочной артериальной гипертензии (ПАН) у нуждающегося в этом пациента, включающему введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с PDGF-B человека, как описано в данном документе; или фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PDGF-B человека, как описано в данном документе, пациенту.

[029] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно, внутривенно, внутридермально, перорально или внутримышечно.

[030] В некоторых вариантах реализации изобретения ПАН влечет за собой состояние, выбранное из группы, состоящей из утолщения легочной артерии у пациента; уменьшения ударного объема у пациента; уменьшения сердечного выброса для правого желудочка у пациента; и уменьшения времени выживания пациента; и введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента обеспечивает лечение состояния или снижение тяжести одного или нескольких симптомов состояния.

[031] В другом аспекте, данное описание относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с PDGF-B человека, как описано в данном документе, для применения в лечении пациента с ПАН.

[032] В другом аспекте, данное описание относится к композиции, содержащей одно или несколько антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с PDGF-B человека, как описано в данном документе, для применения в лечении ПАН.

[033] В другом аспекте, данное описание относится к применению выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с PDGF-B человека, как описано в данном документе, в производстве лекарственного препарата для лечения пациента с РАИ.

[034] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, способны нейтрализовать PDGF-BB, PDGF-AB и/или PDGF-AB/BB и препятствовать обусловленному PDGF потоку кальция в клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, способны нейтрализовать PDGF-BB и препятствовать обусловленному PDGF потоку кальция в клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, способны нейтрализовать PDGF-AB и препятствовать обусловленному PDGF потоку кальция в клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, способны нейтрализовать PDGF-AB/BB и препятствовать обусловленному PDGF потоку кальция в клетке.

[035] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, способны нейтрализовать PDGF-BB, PDGF-AB и/или PDGF-AB/BB и препятствовать обусловленной PDGF клеточной пролиферации. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, способны нейтрализовать PDGF-BB и препятствовать обусловленной PDGF клеточной пролиферации. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, способны нейтрализовать PDGF-AB и препятствовать обусловленной PDGF клеточной пролиферации. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, способны нейтрализовать PDGF-AB/BB и препятствовать обусловленной PDGF клеточной пролиферации.

[036] В некоторых вариантах реализации изобретения клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка выбрана из группы, состоящей из гладкомышечной клетки легочной артерии и первичного фибробласта легкого человека.

[037] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с внешним краем области  $\beta$ -листа PDGF-BB. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с межнитевыми петлями PDGF-BB. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с внешним краем области  $\beta$ -листа и межнитевыми петлями PDGF-BB. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент, описанные в данном документе, связываются с одним или несколькими остатками PDGF-BB, выбранными из группы, состоящей из W40, R73, K80, K81, P82, F84, K86 и R56. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с остатком W40 PDGF-BB. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с остатком R73 PDGF-BB. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с остатком K80 PDGF-BB. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с остатком K81 PDGF-BB. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с остатком P82 PDGF-BB. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с остатком F84 PDGF-BB. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с остатком K86 PDGF-BB. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с остатком R56 PDGF-BB.

[038] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, интернализуются в клетку лиганд-зависимым образом через рецептор PDGF. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка выбрана из группы, состоящей из гладкомышечной клетки легочной артерии и первичного фибробласта легкого человека.

[039] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, способны снижать систолическое давление в правом желудочке у нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, способны снижать гипертрофию правого желудочка у нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, способны снижать систолическое давление в правом желудочке и гипертрофию правого желудочка у нуждающегося в этом пациента.

[040] Другие варианты реализации изобретения будут очевидны из обзора нижеследующего подробного описания.

#### ***КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ***

[041] **Фигура 1** представляет собой график, на котором показаны результаты скрининга моноклональных антител к PDGF от мышей VI-3.

[042] **Фигура 2** представляет собой схему, на которой показано исследование,

осуществляемое для определения показателей кинетики связывания 17 антител к PDGF-B при 25°C и 37 °C.

[043] **Фигура 3А** представляет собой схему, на которой показано исследование по перекрестной конкуренции между очищенными моноклональными антителами к PDGF-BB.

[044] **Фигура 3В** представляет собой матрицу, в которой показаны результаты анализа перекрестной конкуренции антител, в котором первое антитело к PDGF-B (mAb-1) наносили на покрытый PDGF-BB человека наконечник сенсора с последующей обработкой вторым антителом к PDGF-B (mAb-2). Показаны ответы в виде связывания для каждой тестируемой комбинации антител.

[045] **Фигуры 4А-4В** представляют собой графики, на которых показано, что были идентифицированы 5 сильных антител к PDGF-B, которые блокировали >70%; 3 антитела к PDGF-B блокировали как PDGF-BB, так и PDGF-AB с диапазоном значений  $IC_{50}$  для PDGF-BB 0,23-1,8 нМ; 2 антитела к PDGF-B блокировали только PDGF-BB с диапазоном значений  $IC_{50}$  0,55-0,64 нМ; 6 умеренно действующих антител к PDGF-B блокировали >45%; 2 антитела к PDGF-B блокировали как PDGF-BB, так и PDGF-AB с диапазоном значений  $IC_{50}$  для PDGF-BB 2,8-13 нМ; 4 антитела к PDGF-B блокировали только PDGF-BB с диапазоном значений  $IC_{50}$  0,64-2,8 нМ; и 6 антител к PDGF-B не были блокаторами. **Фигура 4С** представляет собой таблицу, в которой обобщены результаты определения характеристик антител к PDGF-B ELISA с блокированием с использованием растворимых PDGF-BB и PDGF-AB и захваченных на планшете PDGFR-бета.

[046] **Фигура 5А** представляет собой график, на котором показано, что 13 из 17 антител к hPDGF-B ингибировали 500 пМ hPDGF BB со значениями  $IC_{50}$  88 пМ - 7,2 нМ с максимальными показателями ингибирования 42-99%. **Фигура 5В** представляет собой график, на котором показано, что два антитела к PDGF-B активировались PDGF-BB человека. **Фигура 5С** представляет собой график, на котором показано, что 8 из 17 антител к hPDGF-B ингибировали 5 нМ PDGF-AB человека со значениями  $IC_{50}$  99 пМ - >50 нМ, с максимальными показателями ингибирования 32-99%. H4H13132P и H4H13145P блокировали до исходного уровня со значениями  $IC_{50}$  8,8 и 2,6 нМ. Наконец, **фигура 5D** представляет собой график, на котором показано, что 10 из 17 антител к hPDGF-B ингибировали 600 пМ PDGF-BB мыши со значениями  $IC_{50}$  450 пМ - 6,4 нМ, с максимальными показателями ингибирования 39-98%.

[047] **Фигуры 6А, 6В и 6С** представляют собой графики, на которых показаны хроматограммы из образцов, образующих наиболее отчетливые соединения mAb:PDGF-BB человека 2:2 без выявляемых комплексов более высокого порядка.

[048] **Фигура 7** представляет собой график, на котором показано, что H4H13145P является более сильным, чем H4H13132P в отношении белков PDGF-BB как человека, так и яванского макака.

[049] **Фигура 8** представляет собой таблицу, показывающую, что коммерческий PDGF-BB обезьяны показал специфическое связывание с mAb к PDGF-B H4H13132P и

H4H13145P.

[050] На **фигуре 9** показан вестерн-блот-анализ связываемых антителом эпитопов, который подтвердил, что H4H13145P связывается с линейными эпитопами rPDGF-BB человека.

[051] **Фигура 10** представляет собой панель графиков, на которых показано, что антитело к PDGF-B обеспечивало лучшую эффективность в отношении двух клинически значимых конечных точек (давление в правом желудочке и гипертрофия) PАН при прямом сравнении с антителом к PDGFR-β.

[052] **Фигура 11** представляет собой панель графиков, на которых показано, что превентивная обработка антителом к PDGF-B обеспечивала снижение как в отношении гемодинамической конечной точки (RVSP), так и гипертрофии правого желудочка в этой крысиной модели PАН.

[053] **Фигура 12** представляет собой панель графиков, на которых показано, что антитело к PDGF-B надежно увеличивало время выживания в модели тяжелой PАН на получающих MCT крысах.

[054] **Фигура 13A** представляет собой панель графиков, на которых показано, что антитело к PDGF-B в низкой дозе 1 мг/кг s.c. обеспечивало эффективность в отношении клинически значимой конечной точки (давление в правом желудочке) PАН.

[055] **Фигура 13B** представляет собой панель графиков, на которых показаны уровни циркулирующего PDGF-B и концентрацию антитела к PDGF-B у Hy/Su мышей на 42-е сутки после введения антитела к PDGF-B.

[056] **Фигура 14** представляет собой панель изображений перицитов, на которых показано, что хотя системная доставка антитела к PDGF-Rβ (2C5, REGN764) приводила к эффективному истощению перицитов, в случае антител к PDGF-BB не наблюдали выраженного эффекта в модели развития сосудов сетчатки (RVD) при 3 мг/кг.

[057] **Фигура 15** представляет собой панель изображений перицитов, на которых показано, что более высокая доза (25 мг/кг) H4H13145P оказывала умеренный эффект в отношении истощения перицитов в модели RVD.

[058] **Фигура 16** представляет собой панель графиков и таблицу, в которых показан фармакокинетический профиль антител к PDFG-B у мышей C57BL/6 дикого типа при трех однократных подкожных дозах 0,1, 1 или 10 мг/кг.

[059] **Фигура 17** представляет собой схему, на которой показан дизайн исследования по оценке влияния длительной обработки здоровых взрослых мышей C57BL высокими дозами антител к PDGF-B на гиперпроницаемость сосудов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), легких или головного мозга.

[060] **Фигура 18** представляет собой панель графиков, на которых показано, что введение дозы антитела к PDGF-B и антител к PDGFRβ не оказывало значимого влияния на увеличение массы тела животного.

[061] **Фигура 19** представляет собой график, на котором показано, что у здоровых мышей отсутствовало значимое изменение в отношении задержки жидкости в желудочно-

кишечном тракте (ЖКТ)/отека в тонкой кишке после обработки IgG в качестве изотипического контроля, антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ .

[062] **Фигура 20** представляет собой панель графиков и изображений, на которых показано, что у мышей отсутствовало значимое изменение в отношении проницаемости сосудов в тонкой кишке при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ .

[063] **Фигура 21** представляет собой график, на котором показано, что у здоровых и обработанных каптоприлом мышей отсутствовало значимое изменение в отношении задержки жидкости в ЖКТ/отека в желудке при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ .

[064] **Фигура 22** представляет собой панель графиков и изображений, на которых показано, что у мышей отсутствовало значимое изменение в отношении проницаемости сосудов в желудке при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ .

[065] **Фигура 23** представляет собой график, на котором показано, что у здоровых и обработанных каптоприлом мышей отсутствовало значимое изменение в отношении задержки жидкости в ЖКТ/отека в легких при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ .

[066] **Фигура 24** представляет собой панель графиков и изображений, на которых показано, что у здоровых и обработанных каптоприлом мышей отсутствовало значимое изменение в отношении проницаемости сосудов в легких при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ .

[067] **Фигура 25** представляет собой график, на котором показано, что у здоровых и обработанных каптоприлом мышей отсутствовало значимое изменение в отношении задержки жидкости в ЖКТ/отека в головном мозге при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ .

[068] **Фигура 26** представляет собой панель графиков и изображений, на которых показано, что у здоровых и обработанных каптоприлом мышей отсутствовало значимое изменение в отношении проницаемости сосудов в головном мозге при обработке антителами к PDGF-B и PDGFR $\beta$ .

[069] **Фигура 27** представляет собой панель графиков, на которых показано ингибирование PDGF-индуцированного потока кальция в гладкомышечных клетках легочной артерии человека (HPASMC) с помощью антител к PDGF-B.

[070] **Фигура 28** представляет собой панель графиков, на которых показано ингибирование PDGF-индуцированной клеточной пролиферации в гладкомышечных клетках легочной артерии человека (HPASMC) с помощью антител к PDGF-B.

[071] **Фигура 29** представляет собой панель графиков, на которых показан анализ интернализации рецепторов с помощью планшет-ридера для флюорометрической визуализации (FLIPR) с использованием гладкомышечных клеток легочной артерии (PASMC), предварительно обработанных комплексами антител к PDGF-B-лиганд.

[072] **Фигура 30** представляет собой график, на котором показано исследование на обработанных монокроталином крысах для оценки с использованием катетера показателей

давления в правом желудочке сердца, которое продемонстрировало, что обработки антителом к PDGF-B обеспечивали снижение систолического давления в правом желудочке, в сравнении с таковым у крыс, обработанных изотипическим контролем.

[073] **Фигура 31** представляет собой график, на котором показано, что превентивная обработка антителами к PDGF-B обеспечивала уменьшение гипертрофии правого желудочка, в сравнении с таковой у крыс, обработанных изотипическим контролем.

[074] **Фигура 32** представляет собой график, на котором показано, что комбинация антагониста рецепторов эндотелина мацитентана с обработкой антителом к PDGF-B не показала дополнительного благоприятного эффекта в отношении выживания, по сравнению с монотерапией антителом к PDGF-B.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[075] Перед тем, как будут описаны способы по данному изобретению, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными способами и условиями проведения экспериментов, поскольку такие способы и условия могут различаться. Также следует понимать, что применяемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации изобретения, и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[076] Если не указано иное, все применяемые в данном документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны рядовому специалисту в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя для реализации на практике или тестирования данного изобретения можно применять любые способы и материалы, подобные или эквивалентные таковым, описанным в данном документе, предпочтительными являются способы и материалы, описанные в данном документе. Все упоминаемые в данном документе публикации включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### *Определения*

[077] Термины «PDGF-B», «PDGFB» и «тромбоцитарный фактор роста В» относятся, взаимозаменяемо, к белку PDGF-B человека, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 (см. также номер доступа в UniProt P01127). Подразумевается, что все упоминаемые в данном документе белки, полипептиды и фрагменты белка относятся к человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они относятся к виду, отличному от человека (например, «PDGF-B мыши», «PDGF-B обезьяны» и т.д.). Уровень циркулирующего и экспрессирующегося в легких PDGF-B, сильного митогена для гладкомышечных клеток и фибробластов легких, повышен как у пациентов, у которых наблюдается идиопатическая РАН, так и в мышечной модели РАН, индуцированной гипоксией/Sugen. Взаимодействия PDGF-B с PDGFR $\beta\beta$ , PDGFR $\alpha\beta$  и PDGFR $\alpha\alpha$  вовлечены в стимуляцию патологической васкуляризации и ремоделирования легочных сосудов. Механистически, нацеливание на PDGF-B обеспечивает повышенную эффективность, не

затрагивая PDGFR $\beta$ , за счет нацеливания на передачу сигналов через PDGFR $\alpha\alpha$ , PDGFR $\alpha\beta$  и PDGFR $\beta\beta$ , которые функционируют вместе, стимулируя аномальное ремоделирование сосудов.

[078] Термин «антитело», в контексте данного документа, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями (т.е. «молекулы полноразмерного антитела»), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи («HCVR» или «VH») и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи («LCVR» или «VL») и константной области легкой цепи (CL). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных, от amino-конца к карбокси-концу, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В определенных вариантах реализации изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественным или искусственным образом модифицированы. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определять на основе сравнительного анализа двух или более CDR.

[079] Также возможно осуществление замены одного или нескольких остатков CDR или удаления одного или нескольких остатков CDR. В научной литературе были описаны антитела, в которых для возможности связывания можно обойтись без одной или двух CDR. Padlan *et al.* (FASEB J. 1995, 9:133-139) проанализировали области контакта антител с их антигенами основываясь на опубликованных данных о кристаллических структурах и сделали вывод, что в действительности только от около одной пятой до одной третьей доли остатков CDR контактируют с антигеном. Согласно работе Padlan, также было обнаружено множество антител, в которых одна или две CDR не содержали аминокислот, которые контактируют с антигеном (см. также Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428).

[080] Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований путем молекулярного моделирования и/или экспериментально. Если CDR или ее остаток(-и) удалены, их, как правило, заменяют на аминокислоту, занимающую соответствующее положение в другой последовательности антитела человека, или консенсусом таких последовательностей. Положения в пределах CDR, по которым будут выполнены замены, и аминокислоты для замены также можно выбирать экспериментально. Экспериментальные замены могут представлять собой консервативные или неконсервативные замены.

[081] Описанные в данном документе полностью человеческие моноклональные антитела к PDGF-B по сравнению с соответствующими последовательностями

зародышевой линии могут включать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей. Такие мутации легко могут быть установлены путем сравнения описанных в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Данное описание включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из описанных в данном документе аминокислотных последовательностей, где одна или несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных и/или CDR-областей подвергаются мутации с заменой на соответствующий(-е) остаток(-и) последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело, или соответствующий(-е) остаток(-и) другой последовательности зародышевой линии, или подлежат консервативной аминокислотной замене соответствующего(-их) остатка(-ов) зародышевой линии (такие изменения по отношению к последовательности в данном документе в совокупности называют «герминативными мутациями»). Специалист в данной области техники исходя из описанных в данном документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей легко сможет получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые включают одну или несколько отдельных герминативных мутаций или их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления все из остатков каркасных и/или CDR-областей в пределах  $V_H$ - и/или  $V_L$ -доменов подвергаются обратной мутации к остаткам, обнаруживаемым в исходной последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело. Согласно другим вариантам осуществления только определенные остатки подвергаются обратной мутации к исходной последовательности зародышевой линии, например, только подвергнутые мутации остатки, обнаруживаемые в пределах 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только подвергнутые мутации остатки, обнаруживаемые в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах реализации изобретения один или несколько из остатков каркасных и/или CDR-областей подвергаются мутации с заменой на соответствующий(-е) остаток(-ки) другой последовательности зародышевой линии (т. е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально происходит антитело). Кроме того, антитела по данному изобретению могут предусматривать любую комбинацию двух или более герминативных мутаций в пределах каркасных и/или CDR-областей, например, где определенные отдельные остатки подвергаются мутации с заменой на соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как определенные другие остатки, которые отличаются от таковых в исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются, или их подвергаются мутации с заменой на соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые предусматривают одну или несколько герминативных мутаций, можно без труда подвергать тестированию в отношении одного

или нескольких требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в соответствующих случаях), сниженная иммуногенность и т. д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, охвачены объемом данного изобретения.

[082] Данное описание также включает полностью человеческие моноклональные антитела к PDGF-B, содержащие варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе, имеющих одну или несколько консервативных замен. Например, данное описание включает антитела к PDGF-B, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами по сравнению с любыми из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе.

[083] Подразумевается, что в данного документа термин «антитело человека» включает антитела с переменными и константными областями, происходящими из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. mAb человека по данному изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, вследствие мутаций, введенных посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или вследствие соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако подразумевается, что термин «антитело человека», в контексте данного документа, не включает mAb, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были привиты на последовательности FR человека.

[084] Термин «легочная гипертензия» («PH») является термином, используемым для описания высокого кровяного давления в легких по любой причине. Термины «гипертензия» или «высокое кровяное давление», с другой стороны, относятся к высокому кровяному давлению в артериях во всем организме.

[085] Термин «легочная артериальная гипертензия» («ПАН») относится к прогрессирующему нарушению со стороны легких, которое характеризуется устойчивым повышением давления в легочной артерии. У таких пациентов с ПАН обычно наблюдается давление в легочной артерии, которое равняется или превышает 25 мм рт. ст. при давлении в легочных капиллярах или левом предсердии равном или менее 15 мм рт. ст. Такие показатели давления обычно измеряют у пациента в состоянии покоя с использованием катетеризации правых отделов сердца. ПАН, при отсутствии лечения, приводит к смерти (в среднем) в течение 2,8 лет после постановки диагноза.

[086] Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) представила клиническую классификацию ПАН на пять групп (Simonneau, *et al. J Am Coll Cardiol.* 2013;62(25\_S), полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки):

1. Легочная артериальная гипертензия (PAH)
  - 1.1. Идиопатическая
  - 1.2. Наследственная
    - 1.2.1. BMPR2
    - 1.2.2. ALK1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
    - 1.2.3. Неизвестного происхождения
  - 1.3. Индуцированная лекарственными средствами и токсинами
  - 1.4. Ассоциированная со следующим:
    - 1.4.1. Ревматические болезни
    - 1.4.2. ВИЧ-инфекция
    - 1.4.3. Портальная гипертензия
    - 1.4.4. Врожденные заболевания сердца
    - 1.4.5. Шистосомоз
- 1'. Легочная веноокклюзионная болезнь (PVOD) и/или легочный капиллярный гемангиоматоз (PCH)
  - 1''. Персистентная легочная гипертензия новорожденных (PPHN)
2. Легочная гипертензия вследствие заболевания левых отделов сердца
  - 2.1. Систолическая дисфункция левого желудочка
  - 2.2. Диастолическая дисфункция левого желудочка
  - 2.3. Клапанный порок
  - 2.4. Врожденная/приобретенная обструкция приносящего/выносящего тракта левого желудочка и врожденные кардиомиопатии
3. Легочная гипертензия вследствие заболевания легких и/или гипоксии
  - 3.1. Хроническое обструктивное заболевание легких
  - 3.2. Интерстициальное заболевание легких
  - 3.3. Другие легочные заболевания со смешанным рестриктивным и обструктивным характером
  - 3.4. Нарушение дыхания во сне
  - 3.5. Нарушения, обуславливающие альвеолярную гиповентиляцию
  - 3.6. Хроническое воздействие больших высот
  - 3.7. Отклонения в развитии
4. Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия (СТЕРН)
5. Легочная гипертензия с неясными многофакторными механизмами
  - 5.1. Нарушения со стороны системы крови: хроническая гемолитическая анемия, миелопролиферативные нарушения, спленэктомия
  - 5.2. Системные нарушения: саркоидоз, легочной гистиоцитоз, лимфангиолейомиоматоз
  - 5.3. Метаболические нарушения: болезнь накопления гликогена, болезнь Гоше, нарушения щитовидной железы
  - 5.4. Другие: опухолевая обструкция, фиброзирующий медиастинит, хроническая

почечная недостаточность с необходимостью диализа, сегментарная РН.

[087] В одном варианте реализации изобретения пациент, который может получить пользу от способов по данному изобретению, является пациентом с РАН группы I (ВОЗ).

[088] РАН на исходном уровне (например, с момента постановки диагноза) может быть легкой, средней или тяжелой степени, как определено, например, функциональным классом ВОЗ, который является мерой тяжести заболевания у пациентов с РАН. Функциональная классификация ВОЗ является адаптацией системы Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA) и обычно используется для качественной оценки толерантности к физической нагрузке, например, при мониторинге прогрессирования заболевания и реакции на лечение (Rubin (2004) *Chest* 126:7-10). В системе ВОЗ признаются четыре функциональных класса:

Класс I: легочная гипертензия без связанного с ней ограничения физической активности;

обычная физическая активность не вызывает чрезмерной одышки или утомляемости, боль в груди или предобморочного состояния;

Класс II: легочная гипертензия, приводящая к небольшому ограничению физической активности;

пациенту комфортно в состоянии покоя; обычная физическая активность вызывает чрезмерную одышку или утомляемость, боль в груди или предобморочное состояние;

Класс III: легочная гипертензия, приводящая к выраженному ограничению физической активности; пациенту комфортно в состоянии покоя; меньшая, чем обычно, активность вызывает чрезмерную одышку или утомляемость, боль в груди или предобморочное состояние; и

Класс IV: легочная гипертензия, приводящая к невозможности бессимптомной физической активности; у больного проявляются признаки правожелудочковой недостаточности; одышка и/или утомляемость могут присутствовать даже в состоянии покоя; дискомфорт усиливается при любой физической активности.

[089] В одном варианте реализации изобретения пациент, который будет получать пользу от способов по данному изобретению, является пациентом, у которого наблюдается, на исходном уровне, РАН, например, РАН группы I (ВОЗ) класса I согласно ВОЗ. В другом варианте реализации изобретения пациент, который будет получать пользу от способов по данному изобретению, является пациентом, у которого наблюдается, на исходном уровне, РАН, например, РАН группы I (ВОЗ) класса II согласно ВОЗ. В другом варианте реализации изобретения пациент, который будет получать пользу от способов по данному изобретению, является пациентом, у которого наблюдается, на исходном уровне, РАН, например, РАН группы I (ВОЗ) класса III согласно ВОЗ.

[090] В контексте данного документа «пациент» является животным, таким как млекопитающее, включая примата (такого как человек, отличный от человека примат, например, обезьяна, и шимпанзе), отличного от примата животного (такого как корова,

свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса, мышь, лошадь и кит) или птицу (например, утку или гуся).

[091] В одном варианте реализации изобретения пациентом является человек, такой как человек, подлежащий лечению или оценке в отношении РАН, например, РАН группы I (ВОЗ); человек с риском развития РАН, например, РАН группы I (ВОЗ); человек с РАН, например, РАН группы I (ВОЗ); и/или человек, подлежащий лечению РАН, например, РАН группы I (ВОЗ), как описано в данном документе.

[092] В контексте данного документа термины «осуществление лечения» или «лечение» относятся к благоприятному или желаемому результату, включая без ограничения ослабление или уменьшение интенсивности одного или нескольких симптомов, ассоциированных с РАН, например, РАН группы I (ВОЗ). «Лечение» может также означать замедление течения заболевания или подавление развития симптома заболевания, снижение степени тяжести развивающегося позднее заболевания или продление выживания по сравнению с ожидаемым выживанием в отсутствие лечения. Например, подавление развития симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием (например, на по меньшей мере около 10% по клинически приемлемой шкале для такого заболевания или нарушения) или отсроченное проявление симптомов (например, на дни, недели, месяца или годы) считается эффективным лечением.

[093] Термин «специфически связывает» или «специфически связывается с» и т. п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют с антигеном комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться равновесной константой диссоциации по меньшей мере около  $1 \times 10^{-6}$  М или меньше (например, меньшее значение  $K_D$  означает более сильное связывание). Способы определения того, происходит ли специфическое связывание двух молекул, хорошо известны в данной области техники, и они включают, например, равновесный диализ, метод поверхностного плазмонного резонанса и т. д. Как описано в данном документе, антитела, которые специфически связываются с PDGF-B, были идентифицированы с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™. Более того, полиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом PDGF-B и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя разными областями PDGF-B, в контексте данного документа считаются антителами, которые «специфически связывают».

[094] Термин «высокоаффинное антитело» относится к таким mAb, которые имеют аффинность связывания в отношении PDGF-B, выраженную в  $K_D$ , по меньшей мере  $10^{-7}$  М; предпочтительно  $10^{-8}$  М; более предпочтительно  $10^{-9}$  М, даже более предпочтительно  $10^{-10}$  М, даже более предпочтительно  $10^{-11}$  М, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, или ELISA с определением аффинности в растворе.

[095] Под термином «низкая скорость диссоциации», «Koff» или «kd» подразумевают антитело, которое диссоциирует от PDGF-B с константой скорости  $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$  или меньше, предпочтительно  $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$  или меньше, как определено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™.

[096] Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. д. в контексте данного документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или полученный с помощью методов генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела» в контексте данного документа относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с PDGF-B.

[097] В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или фрагменты антитела по данному изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическим соединением («иммуноконъюгат»), таким как антибиотик, второе антитело к PDGF-B или антитело к цитокину, такому как IL-1, IL-6 или TGF- $\beta$ , или любым другим терапевтическим соединением, пригодным для лечения легочной артериальной гипертензии.

[098] Подразумевается, что в контексте данного документа «выделенное антитело» относится к антителу, которое практически не содержит других антител (Ab) с другими типами антигенной специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывает PDGF-B, или его фрагмент, практически не содержит Ab, которые специфически связывают антигены, отличные от PDGF-B).

[099] Термин «поверхностный плазмонный резонанс» в контексте данного документа относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать взаимодействия биологических молекул в режиме реального времени путем выявления изменений концентраций белков на матрице в виде биосенсора, например, с применением системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция, и Пискатауэй, Нью-Джерси).

[0100] Подразумевается, что в контексте данного документа термин «K<sub>D</sub>» относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

[0101] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим центром в пределах варибельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более чем один эпитоп. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и могут оказывать разные биологические эффекты. Термин «эпитоп» также относится к участку на антигене, на который реагируют B- и/или T-клетки. Он также относится к области антигена, которую связывает антитело. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно представляют собой разновидность структурных эпитопов, и содержат такие остатки, которые непосредственно влияют на аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут

быть конформационными, то есть состоящими из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах реализации изобретения эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные группы на поверхности молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи из сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, согласно определенным вариантам осуществления, могут обладать специфическими характеристиками трехмерной структуры и/или специфическими характеристиками заряда.

[0102] Термин «значительная степень идентичности» или «в значительной степени идентичный», когда речь идет о нуклеиновой кислоте или ее фрагменте, означает, что при оптимальном выравнивании, с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями, с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью), имеет место идентичность нуклеотидных последовательностей по меньшей мере по около 90% и более предпочтительно по меньшей мере по около 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая значительную степень идентичности с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в определенных случаях, кодировать полипептид с аналогичной или в значительной степени подобной аминокислотной последовательностью, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

[0103] Применительно к полипептидам термин «значительное подобие» или «в значительной степени подобный» означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием стандартных штрафов за открытие гэпа, характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется на другой аминокислотный остаток с боковой цепью (R-группа) с подобными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень подобия могут быть увеличены с внесением поправки на консервативную природу замены. Способы внесения такой корректировки хорошо известны специалисту в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с подобными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические боковые цепи с гидроксильной группой: 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. Предпочтительными группами для консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте, консервативное замещение представляет собой любое изменение с положительным значением в логарифмической таблице вероятностей PAM250, описанной в Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45, включенной в данный документ посредством ссылки. «Средне консервативное» замещение представляет собой любое изменение с неотрицательным значением в логарифмической таблице вероятностей PAM250.

[0104] Подобие последовательностей для полипептидов, как правило, определяют с применением программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков позволяет сопоставлять подобные последовательности с помощью определения подобия с учетом разных замен, делеций и других модификаций, включая консервативные аминокислотные замены. К примеру, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно применять с использованием параметров по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантным вариантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с помощью параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между заданными и искомыми последовательностями (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по данному изобретению с базой данных, содержащей большое число последовательностей от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

[0105] В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или фрагмент антитела для применения в способе по данному изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении эпитопов более чем одного целевого полипептида.

[0106] Подразумевается, что фраза «терапевтически эффективное количество» в контексте данного документа включает количество антитела к PDGF-B или его

антигенсвязывающего фрагмента, которое, при введении пациенту с РАН, например, РАН группы I (ВОЗ), является достаточным для осуществления лечения заболевания (например, путем ослабления, уменьшения интенсивности или поддержания имеющегося заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания) или контроля заболевания. «Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента, от того, как антитело к PDGF-B или его антигенсвязывающий фрагмент вводят, заболевания и его тяжести и истории болезни, возраста, массы, семейного анамнеза, генетических характеристик, стадии РАН, типов предшествующего или сопутствующего лечения, если таковое имеется, и других индивидуальных характеристик пациента, которого будут лечить.

[0107] Подразумевается, что «терапевтически эффективное количество» также включает количество антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента, которое, при введении пациенту, является достаточным для уменьшения интенсивности заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Уменьшение интенсивности заболевания включает замедление течения заболевания или снижение степени тяжести развивающегося позднее заболевания.

[0108] «Терапевтически эффективное количество» также включает количество антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента, которое дает некоторый желаемый местный или системный эффект при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому лечению. Антитела к PDGF-B или их антигенсвязывающие фрагменты, используемые в способах по данному изобретению, можно вводить в количестве, достаточном для достижения разумного соотношения польза/риск, применимого к такому виду лечения.

#### Общее описание

[0109] Тромбоцитарные факторы роста (PDGF) являются сильными митогенами, которые существуют в виде пяти разных димерных конфигураций, состоящих из четырех разных субъединиц, являющихся изоформами: А, В, С и D. Пять димерных форм PDGF представляют собой AA, BB, AB, CC и DD, которые образованы посредством дисульфидной связи соответствующих отдельных мономеров PDGF. Лиганды PDGF проявляют свои биологические эффекты посредством взаимодействий с рецепторами PDGF (PDGFR). PDGFR являются трансмембранными тирозинкиназными рецепторами, которые пересекают мембрану один раз, состоящими из гетеродимерных или гомодимерных ассоциаций цепи альфа ( $\alpha$ ) рецептора (PDGFR-альфа) и/или цепи бета ( $\beta$ ) рецептора (PDGF-B). Таким образом, активные PDGFR могут состоять из пар цепей рецептора  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  или  $\alpha\beta$ . PDGFR имеют общую доменную структуру, включающую пять внеклеточных иммуноглобулиновых (Ig) петель, трансмембранный домен и расщепленный внутриклеточный тирозинкиназный (ТК) домен. Взаимодействие между димерными PDGF-лигандами и PDGFR приводит к димеризации цепей рецептора, аутофосфорилированию рецептора и внутриклеточной сигнальной трансдукции. Было продемонстрировано *in vitro*, что  $\beta\beta$ -рецепторы активируются PDGF-BB и -DD, тогда как

$\alpha\beta$ -рецепторы активируются PDGF-BB, -CC, -DD и -AB, и  $\alpha\alpha$ -рецепторы активируются PDGF-AA, -BB, -CC и -AB (см. Andrae *et al.* (2008) *Genes Dev* 22(10): 1276-1312).

[0110] Антитела, описанные в данном документе, демонстрируют специфическое связывание с PDGF-B, и, в некоторых вариантах реализации изобретения, могут быть пригодны для лечения пациентов, страдающих легочной артериальной гипертензией. Их можно использовать отдельно или в качестве вспомогательной терапии с другими терапевтическими соединениями или методами, известными в данной области техники, для лечения легочной артериальной гипертензии, такими как без ограничения восполняющее введение железа за счет пищевых добавок, содержащих железо, диетические изменения для повышения уровня железа в сыворотке крови и/или внутривенное введение железа, переливание крови и препараты, стимулирующие повышение уровня железа. Их можно использовать в сочетании с дополнительными антителами, специфическими в отношении антигенов, отличных от PDGF-B, или их можно комбинировать с другими типами лечения.

[0111] В некоторых вариантах реализации изобретения антитела, описанные в данном документе, могут быть пригодны в предупреждении, лечении или контроле легочной артериальной гипертензии.

[0112] В определенных вариантах реализации изобретения антитела по данному изобретению получают от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как нативный полноразмерный PDGF-B человека (SEQ ID NO: 41) или фрагменты PDGF-B, с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном или иммуногенно активным фрагментом PDGF-B.

[0113] Иммуноген может представлять собой иммуногенный фрагмент PDGF-B или ДНК, кодирующую его фрагмент. Иммуноген может представлять собой PDGF-B, связанный с гистиридиновой меткой и/или с фрагментом Fc-области антитела.

[0114] Аминокислотная последовательность полноразмерного PDGF-B человека показана как SEQ ID NO: 41.

[0115] В определенных вариантах реализации изобретения антитела, которые специфически связываются с PDGF-B, можно получать с применением фрагментов указанных выше областей или пептидов, которые выступают за границы определенных областей на от около 5 до около 20 аминокислотных остатков от каждого, или от обоих N- или C-конца областей, описанных в данном документе. В определенных вариантах реализации изобретения для получения PDGF-B-специфических антител можно использовать любую комбинацию указанных выше областей или их фрагментов. В определенных вариантах реализации изобретения для получения моноспецифических, биспецифических или полиспецифических антител можно использовать любые одну или несколько из указанных выше областей PDGF-B или их фрагментов.

Антигенсвязывающие фрагменты антител

[0116] Если конкретно не указано иное, следует понимать, что термин «антитело» в контексте данного документа охватывает молекулы антитела, содержащие две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (т. е. «молекулы полного

антитела)), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. д. в контексте данного документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или полученный с помощью методов геной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела» в контексте данного документа относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с PDGF-B. Фрагмент антитела может включать Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или выделенный CDR. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полных антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как методики на основе протеолитического расщепления или методы генетической инженерии рекомбинантных ДНК, предусматривающие осуществление манипуляций и экспрессии ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антител. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, ДНК-библиотек (включая, например, фаговые библиотеки антител), или она может быть синтезирована. ДНК можно подвергать секвенированию и химическим манипуляциям, используя методы молекулярной биологии, например, чтобы разместить один или несколько переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для включения кодонов, внесения цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

[0117] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) молекулы одноцепочечных Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), как, например, CDR3-пептид), или пространственно ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, наноантитела (например, одновалентные наноантитела, двухвалентные наноантитела и т. д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, в контексте данного документа также охвачены выражением «антигенсвязывающий фрагмент».

[0118] Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав, и обычно будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая примыкает к одной или нескольким каркасным последовательностям или находится с ними в одной рамке считывания. В антигенсвязывающих фрагментах с V<sub>H</sub>-

доменом, ассоциированным с  $V_L$ -доменом,  $V_H$ - и  $V_L$ -домены могут быть расположены относительно друг друга в любой подходящей конфигурации. Например, переменная область может быть димерной 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.

[0119] В определенных вариантах реализации 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 можно найти в пределах антигенсвязывающего фрагмента 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 константных доменов, включая любую из приведенных выше иллюстративных конфигураций, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно соединены друг с другом, либо могут быть соединены посредством полной или частичной шарнирной области или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые обеспечивают гибкое или полугибкое соединение расположенных рядом переменных и/или константных доменов в пределах одной молекулы полипептида. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по данному изобретению может предусматривать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из приведенных выше конфигураций переменных и константных доменов, нековалентно связанные друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными  $V_H$ - или  $V_L$ -доменами (например, посредством дисульфидной(дисульфидных) связи(связей)).

[0120] Как и в случае молекул полных антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат полиспецифического антитела, включая иллюстративные форматы биспецифического антитела, описанные в данном документе, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по данному изобретению, используя обычные методики, известные в данной области техники.

[0121] Данное описание включает антитела к PDGF-B и антигенсвязывающие фрагменты с иммуноглобулиновыми цепями, которые включают аминокислотные последовательности, изложенные в данном документе, а также варианты, имеющие клеточные и/или *in vitro* посттрансляционные модификации. Например, данное описание включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически

связываются с PDGF-B, содержащие аминокислотные последовательности тяжелой и/или легкой цепи, изложенные в данном документе (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3), а также антитела и фрагменты, в которых один или несколько аминокислотных остатков гликозилированы, один или несколько Asp-остатков подвергнуты дезамидированию, один или несколько остатков (например, Met, Trp и/или His) окислены, N-концевой Gln представляет собой пироглутамат (ругоE) и/или C-концевой лизин отсутствует.

[0122] Данное описание включает рекомбинантные способы получения антител к PDGF-B или их антигенсвязывающих фрагментов, или их иммуноглобулиновой цепи, включающие (i) введение одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих легкую и/или тяжелую иммуноглобулиновую цепь указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента (например, тяжелую цепь или ее  $V_H$  или иммуноглобулин, содержащий его HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и/или легкую цепь или ее  $V_L$  или иммуноглобулин, содержащий его LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем, например, полинуклеотид находится в векторе и/или функционально связан с промотором; (ii) культивирование клетки-хозяина (например, клетки яичника китайского хомячка (CHO), или клетки *Pichia*, или клетки *Pichia pastoris*), в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида(полинуклеотидов), и (iii) необязательно выделение антитела, или фрагмента или цепи, из клетки-хозяина и/или среды, в которой растет клетка-хозяин. При получении антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащих более одной иммуноглобулиновой цепи, например, антитела, которое содержит две тяжелые иммуноглобулиновые цепи и две легкие иммуноглобулиновые цепи, коэкспрессия цепей в одной клетке-хозяине приводит к ассоциации цепей, например, в клетке, или на поверхности клетки, или вне клетки, если такие цепи секретируются, с образованием молекулы антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Способы включают таковые, в которых экспрессируются только тяжелая иммуноглобулиновая цепь или только легкая иммуноглобулиновая цепь (например, любая из цепей, обсуждаемых в данном документе, включая их зрелые фрагменты и/или переменные домены). Такие цепи являются пригодными, например, в качестве промежуточных продуктов в экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые включают такую цепь. Данное описание включает продукты таких способов экспрессии (например, антител, антигенсвязывающих фрагментов,  $V_H$  или  $V_L$ ).

#### Получение антител человека

[0123] Способы получения антител человека в трансгенных мышцах известны в данной области техники. Любые из таких известных способов можно использовать в контексте данного описания для получения антител человека, которые специфически связываются с PDGF-B.

[0124] Используя технологию VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любой другой известный способ получения моноклональных антител, сперва выделяли высокоаффинные химерные антитела к PDGF-B с переменной областью человека и константной областью мыши.

Технология VELOCIMMUNE® предусматривает получение трансгенной мыши с геномом, предусматривающим последовательности, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей человека, функционально связанные с эндогенными локусами, кодирующими константные области мыши, благодаря чему у мыши в ответ на стимуляцию антигеном вырабатывается антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши. ДНК, кодирующую переменные области тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелых и легких цепей человека. Затем обеспечивают экспрессию ДНК в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

[0125] В общем случае, полученную с помощью технологии VELOCIMMUNE® мышь иммунизируют представляющим интерес антигеном и извлекают лимфоциты (такие как В-клетки) из организма мышей, у которых экспрессируются антитела. Лимфоциты можно сливать с клеточной линией миеломы с получением бессмертных линий клеток гибридомы, и такие линии клеток гибридомы подвергают скринингу и отбору для идентификации линий клеток гибридомы, которые продуцируют антитела, специфические в отношении представляющего интерес антигена. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделять и связывать с требуемыми изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок-антитело может продуцироваться в клетке, такой как клетка СНО. В альтернативном варианте, ДНК, кодирующую антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легких и тяжелых цепей, можно выделять непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

[0126] Сперва выделяют высокоаффинные химерные антитела с переменной областью человека и константной областью мыши. Определяют характеристики антител и отбирают их в отношении требуемых характеристик, включая аффинность, избирательность, эпитоп и т. д. Константные области мыши замещают требуемой константной областью человека с получением полностью человеческого антитела по данному изобретению, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированных IgG1 или IgG4. Тогда как выбранная константная область может варьировать в соответствии с конкретным применением, характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности в отношении мишени свойственны переменной области.

[0127] В целом, антитела по данному изобретению обладают очень высокими значениями аффинности, обычно обладая  $K_D$  от около  $10^{-12}$  до около  $10^{-7}$  М, в случае измерения с помощью связывания с антигеном, либо иммобилизованным в твердой фазе, либо находящимся в жидкой фазе. Константные области мыши замещают требуемыми константными областями человека с получением полностью человеческих антител по данному изобретению. Тогда как выбранная константная область может варьировать в соответствии с конкретным применением, характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности в отношении мишени свойственны переменной области.

Биоэквиваленты

[0128] Антитела к PDGF-B и фрагменты антител по данному изобретению охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых у описанных антител, но которые сохраняют способность связываться с PDGF-B. Такие варианты антитела и фрагменты антител включают одно или несколько добавлений, делеций, или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но характеризуются биологической активностью, которая, по сути, эквивалентна таковой у описанных антител. Аналогично, кодирующие антитело последовательности ДНК по данному изобретению охватывают последовательности, которые включают одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с описанной последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые, по сути, являются биоэквивалентами антитела или фрагмента антитела по данному изобретению.

[0129] Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими вариантами, скорость и степень абсорбции которых не характеризуется значимым различием при введении в одинаковой молярной дозе в аналогичных условиях проведения эксперимента, как в виде однократной дозы, так и в виде многократных доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими вариантами, если они являются эквивалентными по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все еще могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в инструкции по применению лекарственного препарата, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном применении, и не считаются значимыми с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

[0130] В одном варианте реализации изобретения два антигенсвязывающих белка считаются биоэквивалентными, если клинически значимые различия в их безопасности, чистоте и эффективности отсутствуют.

[0131] В одном варианте реализации изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно переводить один или несколько раз с лечения референтным препаратом на лечение биологическим препаратом, и наоборот, без ожидаемого повышения риска возникновения нежелательных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или уменьшенную эффективность, по сравнению с продолжающейся терапией без такого перевода.

[0132] В одном варианте реализации изобретения два антигенсвязывающих белки являются биоэквивалентными, если они оба функционируют по общему механизму или механизмам действия в отношении состояния или состояний, при условии, что такие механизмы являются известными.

[0133] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью *in vivo* и/или *in vitro* способов. Определение биоэквивалентности включает, например, (a) *in vivo*

тест у людей или других млекопитающих, в котором измеряют концентрацию антитела или его метаболитов в крови, плазме крови, сыворотке крови или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) *in vitro* тест, результаты которого коррелировали с данными по биодоступности *in vivo* у человека, и который является достаточно прогностическим в отношении таких данных; (c) *in vivo* тест у людей или других млекопитающих, в котором соответствующий немедленный фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется в зависимости от времени; и (d) клиническое испытание в строго контролируемых условиях, в котором устанавливают безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

[0134] Биоэквивалентные варианты антител по данному изобретению могут быть сконструированы, например, путем выполнения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно удалять или замещать другими аминокислотами для предотвращения образования лишних или неуместных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других случаях биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител, предусматривающие изменения по аминокислоте, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые исключают или устраняют гликозилирование.

Антитела к PDGF-B, содержащие варианты Fc

[0135] Согласно определенным вариантам реализации данного изобретения представлены антитела к PDGF-B, содержащие Fc-домен, включающий одну или несколько мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с FcRn-рецептором, например, при кислом pH, в сравнении с нейтральным pH. Например, данное описание включает антитела к PDGF-B, включающие мутацию в C<sub>H</sub>2- или C<sub>H</sub>3-области Fc-домена, причем мутация(мутации) повышает(повышают) аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где уровень pH находится в диапазоне от около 5,5 до около 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению времени полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному.

[0136] Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в пределах описанных в данном документе переменных доменов антитела включены в объем данного изобретения.

[0137] Данное описание также включает антитела к PDGF-B, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C<sub>H</sub>), причем химерная C<sub>H</sub>-область содержит сегменты, происходящие из C<sub>H</sub>-областей более чем одного изотипа иммуноглобулинов. Например, антитела по данному изобретению могут содержать химерную C<sub>H</sub>-область, содержащую часть или все из C<sub>H</sub>2-доменов, происходящих из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с частью или всеми из C<sub>H</sub>3-доменов, происходящих из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно определенным

вариантам реализации, антитела по данному изобретению содержат химерную C<sub>H</sub>-область, имеющую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность «верхнего шарнира» (аминокислотные остатки, соответствующие положениям 216-227 согласно EU-нумерации), происходящую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с последовательностью «нижнего шарнира» (аминокислотные остатки, соответствующие положениям 228-236 согласно EU-нумерации), происходящей из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно определенным вариантам реализации изобретения химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, происходящие из верхнего шарнира IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, происходящие из нижнего шарнира IgG2 человека. Антитело, содержащее описанную в данном документе химерную C<sub>H</sub>-область, в определенных вариантах реализации изобретения может проявлять эффекторные функции модифицированного Fc без отрицательного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, предварительную заявку на патент США № 61/759,578, поданную 1 февраля 2013 года, описание которой включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

#### Биологические характеристики антител

[0138] В целом, антитела по данному изобретению могут функционировать путем связывания с PDGF-B. В некоторых вариантах реализации антитела по данному изобретению могут связываться с другим антигеном (перекрестно-реактивные антитела).

[0139] В определенных вариантах реализации антитела по данному изобретению могут представлять собой биспецифические антитела. Биспецифические антитела по данному изобретению могут связывать один эпитоп в одном домене и могут также связывать один эпитоп во втором домене PDGF-B. В определенных вариантах реализации биспецифические антитела по данному изобретению могут связывать два разных эпитопа в одном и том же домене.

[0140] В одном варианте реализации изобретения данное описание относится к полностью человеческому моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с PDGF-B, причем антитело или его фрагмент проявляют одну или несколько из следующих характеристик: (i) содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22, или в значительной степени подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (ii) содержат LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30, или в значительной степени подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iii) содержат HCDR3-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 28, или в

значительной степени подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и LCDR3-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 36, или в значительной степени подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iv) содержат HCDR1-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 24, или в значительной степени подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; HCDR2-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 26, или в значительной степени подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; LCDR1-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 32, или в значительной степени подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и LCDR2-домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 34, или в значительной степени подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и (v) связываются с PDGF-B с  $K_D$ , равной или меньше  $10^{-7}$ .

[0141] Определенные антитела к PDGF-B по данному изобретению способны связываться с PDGF-B и нейтрализовать его активность, как определено с помощью *in vitro* или *in vivo* анализов. Способность антител связываться с PDGF-B и нейтрализовать его активность можно измерять, используя любой стандартный способ, известный специалистам в данной области техники, включая анализы связывания или анализы активности, как описано в данном документе.

[0142] Пептиды можно модифицировать с включением добавления или замены определенных остатков для введения метки или с целью конъюгирования с молекулами-носителями, например, KLH. Например, либо к N-концу, либо к C-концу пептида можно добавлять цистеин, или можно добавлять линкерную последовательность с целью получения пептида для конъюгирования, например, с KLH, для иммунизации.

[0143] Специфические в отношении PDGF-B антитела могут не содержать дополнительных меток или соединений, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или соединение. В одном варианте реализации изобретения метка или соединение представляет собой биотин. В анализе связывания, расположение метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида по отношению к поверхности, на которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет расположен так, что C-концевая часть пептида

будет отдалена от поверхности. В одном варианте реализации изобретения метка может представлять собой радиоизотоп, флуоресцентный краситель или MRI-выявляемую метку. В определенных вариантах реализации изобретения такие меченные антитела можно применять в диагностических анализах, включая анализы с визуализацией.

#### Картирование эпитопа и родственные технологии

[0144] Данное описание включает антитела к PDGF-B, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, обнаруженными в пределах одной или нескольких областей PDGF-B. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или больше (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше) аминокислот, расположенных в пределах любой из вышеупомянутых областей молекулы PDGF-B (например, линейный эпитоп домена). В альтернативном варианте, эпитоп может состоять из множества прерывающихся аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в пределах любой из или всех вышеупомянутых областей молекулы PDGF-B (например, конформационный эпитоп).

[0145] Для определения того факта, что антитело «взаимодействует с одним или несколькими аминокислотами» в пределах полипептида или белка, можно применять различные методики, известные специалистам в данной области техники. Иллюстративные методики включают, например, стандартные эпитоп-перекрестные конкурентные анализы, как, например, описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк). Другие способы включают мутационный анализ со сканированием аланином, блот-анализ пептидов (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), кристаллографические исследования с анализом расщепления пептидов и ЯМР-анализ. Кроме того, можно использовать такие способы, как метод вырезания эпитопа, метод выделения эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Protein Science* 9: 487-496). Другим способом, который можно использовать для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водородно-дейтериевого обмена предусматривает мечение представляющего интерес белка дейтерием, с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, и способные к обмену протоны в аминокислотах, закрытые будучи в комплексе с антителом, подвергаются обратному обмену дейтерия на водород медленнее, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью зоны контакта. В результате аминокислоты, которые образуют часть зоны контакта белок/антитело, могут сохранять в своем составе дейтерий и, таким образом, характеризоваться относительно большей массой по сравнению с аминокислотами, не включенными в зону контакта. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, с выявлением таким образом пептидов, содержащих меченные дейтерием остатки, которые соответствуют специфическим аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См.,

например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

[0146] Термин «эпитоп» относится к участку на антигене, на который реагируют В-и/или Т-клетки. Эпитопы для В-клеток могут быть образованы как непрерывными, так и прерывающимися аминокислотами, расположенными рядом благодаря укладке белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные из непрерывных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные благодаря укладке в третичную структуру, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3, и, чаще, по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

[0147] Анализ на основе модификаций (Modification-Assisted Profiling, MAP), также известный как анализ антител на основе структуры антигенов (Antigen Structure-based Antibody Profiling, ASAP), представляет собой способ, который позволяет классифицировать большие количества моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, исходя из схожести профилей связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигенов (см. US 2004/0101920, включенную в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Каждая категория может соответствовать уникальному эпитопу, который либо явно отличается от эпитопа, соответствующего другой категории, либо частично перекрывается с ним. Такая технология позволяет исключать генетически идентичные антитела, благодаря чему определение характеристик может быть сфокусировано на генетически отличающихся антителах. В случае применения для скрининга гибридом, MAP может облегчить идентификацию редких клонов гибридом, которые продуцируют mAb с требуемыми характеристиками. MAP можно применять для распределения антител по данному изобретению на группы антител, связывающих разные эпитопы.

[0148] В определенных вариантах реализации изобретения антитела к PDGF-B или их антигенсвязывающие фрагменты связывают эпитоп в пределах любой одной или нескольких из областей, представленных в PDGF-B человека, представленной в SEQ ID NO: 41, или его фрагмент.

[0149] Данное описание включает антитела к PDGF-B человека, которые связываются с тем же эпитопом, или частью эпитопа, что и любое из специфических иллюстративных антител, описанных в данном документе, или антитело с последовательностями CDR из любого из иллюстративных антител, описанных в данном документе. Аналогично, данное описание также включает антитела к PDGF-B, которые конкурируют за связывание с PDGF-B или фрагментом PDGF-B с любым из специфических иллюстративных антител, описанных в данном документе, или антителом, имеющим последовательности CDR из любого из иллюстративных антител, описанных в данном документе.

[0150] Используя известные в данной области техники стандартные способы, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к PDGF-B, или конкурирует ли с ним за связывание. Например, для определения того, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к PDGF-B по данному изобретению, обеспечивают связывание эталонного антитела с белком или пептидом PDGF-B в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой PDGF-B. Если тестируемое антитело способно связываться с PDGF-B после насыщающего связывания с использованием эталонного антитела к PDGF-B, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с эпитопом, отличным от такового для эталонного антитела к PDGF-B. Напротив, если тестируемое антитело не способно связываться с белком PDGF-B после насыщающего связывания с использованием эталонного антитела к PDGF-B, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный эталонным антителом к PDGF-B по данному изобретению.

[0151] Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом к PDGF-B, осуществляют описанный выше метод на основе связывания в двух направлениях: При осуществлении метода в первом направлении обеспечивают связывание эталонного антитела с белком PDGF-B в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой PDGF-B. При осуществлении метода во втором направлении обеспечивают связывание тестируемого антитела с молекулой PDGF-B в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой PDGF-B. Если, при осуществлении метода в обоих направлениях, только первое (насыщающее связывание) антитело способно к связыванию с молекулой PDGF-B, то делают вывод, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с PDGF-B. Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно должно связываться с эпитопом, идентичным таковому для эталонного антитела, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела за счет связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

[0152] Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентным образом ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. А именно, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого на по меньшей мере 50%, а предпочтительно 75%, 90% или даже 99%, как измерено в конкурентном анализе связывания (см., например, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 1990 50:1495-1502). В качестве альтернативы, два антитела связывают один и тот же эпитоп, если практически все мутации по аминокислотам в антигене, которые снижают или исключают связывание одного антитела, снижают или исключают связывание другого. Два антитела связывают перекрывающиеся эпитопы, если некоторые мутации по аминокислотам, которые снижают или исключают связывание одного антитела, снижают или исключают связывание другого.

[0153] Затем можно осуществлять дополнительные стандартные эксперименты (например, мутирование пептидов и анализы связывания) для подтверждения того, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено связыванием с тем же эпитопом, что и эпитоп для эталонного антитела, или же за отсутствие наблюдаемого связывания отвечает стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого типа можно осуществлять с применением ELISA, RIA, метода поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого известного из данной области техники количественного или качественного анализа связывания антител.

#### Иммуноконъюгаты

[0154] Данное описание охватывает моноклональное антитело к PDGF-B человека, конъюгированное с терапевтическим соединением («иммуноконъюгат»), таким как средство, которое способно к снижению степени тяжести легочной артериальной гипертензии или к уменьшению интенсивности по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с легочной артериальной гипертензией. В контексте данного документа термин «иммуноконъюгат» относится к антителу, которое химически или биологически связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, нацеливающим или репортерным соединением, ферментом, токсином или терапевтическим средством. Антитело может быть связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, нацеливающим или репортерным соединением, ферментом, токсином или терапевтическим средством в любом местоположении вдоль всей молекулы при условии, что оно сохраняет способность связывать свою мишень. Примером иммуноконъюгата является конъюгат антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации изобретения средство может представлять собой второе отличающееся антитело к PDGF-B или к цитокину, такому как IL-1, IL-6, или хемокину, такому как TGF- $\beta$ . Тип терапевтического соединения, которое может быть конъюгировано с антителом к PDGF-B, будет зависеть от состояния, подлежащего лечению, и от требуемого терапевтического эффекта, который должен быть достигнут. Примеры подходящих средств для образования иммуноконъюгатов известны в данной области техники; см., например, WO 05/103081. Получение иммуноконъюгатов и иммунотоксинов в целом хорошо известно в данной области техники (см., например, заявку на выдачу патента США № 4340535). Иммуноконъюгаты детально описаны, например, в US 7250492, US 7420040 и US 7411046, каждая из которых в полном объеме включена в данный документ.

#### Полиспецифические антитела

[0155] Антитела по данному изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела по данному изобретению могут быть связаны

с или коэспрессированы с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического сочетания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным способом) с одним или несколькими другими соединениями, такими как другое антитело или фрагмент антитела, для получения биспецифического или полиспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Например, данное описание включает биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина является специфическим в отношении N-концевой области PDGF-B, или его фрагмента, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим в отношении C-концевой области PDGF-B, или второй терапевтической мишени, или конъюгировано с терапевтическим соединением. Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно применять в контексте данного изобретения, предусматривает применение первого C<sub>H3</sub>-домена иммуноглобулина (Ig) и второго C<sub>H3</sub>-домена Ig, где первый и второй C<sub>H3</sub>-домены Ig отличаются друг от друга по меньшей мере по одной аминокислоте, и где отличие по меньшей мере по одной аминокислоте обуславливает снижение способности связывания биспецифического антитела с PDGF-B по сравнению с биспецифическим антителом, не характеризующимся таким отличием по аминокислоте. Вариации описанного выше формата биспецифического антитела включены в объем данного изобретения.

[0156] Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте данного изобретения, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или в виде диатела, биспецифические форматы в виде слияний IgG-scFv, Ig с двойными вариабельными доменами (DVD), Quadroma, антитела со структурой «выступ во впадину», антитела с общей легкой цепью (например, антитела с общей легкой цепью со структурой «выступ во впадину» и т. д.), CrossMab, CrossFab, полученного на основе технологии SEED антитела ((SEED)body), антитела, полученного путем опосредованной лейциновой застежкой димеризации, Duobody, IgG1/IgG2, IgG с Fab двойного действия (DAF) и биспецифические форматы Mab<sup>2</sup> (см., например, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, и цитируемые в ней ссылки, для обзора перечисленных выше форматов). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с использованием конъюгирования пептид/нуклеиновая кислота, например, где применяют аминокислоты не природного происхождения с перекрестной химической активностью для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самособираются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

#### Терапевтическое введение и составы

[0157] Данное описание относится к терапевтическим композициям, содержащим антитела к PDGF-B или их антигенсвязывающие фрагменты, как обсуждается в данном документе. Терапевтические композиции согласно данному описанию вводятся с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые

включают в составы, чтобы обеспечить улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Такие составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липид (катионный или анионный) везикулы (например, LIPOFECTIN®), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии типа «масло в воде» и «вода в масле», Carbowax в виде эмульсий (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие Carbowax. См. также Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[0158] Доза антитела может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, которому его будут вводить, целевого заболевания, состояний, пути введения и т. д. Если антитело по данному изобретению используется для предупреждения или лечения легочной артериальной гипертензии, целесообразным является внутривенное введение антитела по данному изобретению, обычно в однократной дозе от около 0,1 до около 100 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 5 до около 100, от около 10 до около 90 или от около 20 до около 70 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частоту и продолжительность лечения можно корректировать. В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению можно вводить в виде начальной дозы, составляющей по меньшей мере от около 0,1 мг до около 800 мг, от около 1 до около 500 мг, от около 5 до около 300 мг или от около 10 до около 200 мг, до около 100 мг или до около 50 мг. В определенных вариантах реализации изобретения после начальной дозы можно осуществлять введение второй или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть примерно таким же или меньшим, чем количество в случае начальной дозы, где введение последующих доз разделено промежутком времени, составляющим от по меньшей мере 1 суток до 3 суток; по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 14 недель.

[0159] Известны различные системы доставки, и их можно использовать для введения фармацевтической композиции по данному изобретению, например, включение 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 без ограничения внутридермальный, чрескожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути введения. Композиция может быть введена любым подходящим путем, например, посредством инфузии или болюсной инъекции, за счет абсорбции через эпителиальные или кожно-

слизистые выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и тонкой кишки и т. д.), и может быть введена вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическую композицию также можно доставлять в составе везикулы, в частности, липосомы (см., например, Langer (1990) *Science* 249:1527- 1533).

[0160] Применение наночастиц для доставки антител по данному изобретению также включено в данный документ. Конъюгированные с антителом наночастицы можно использовать как для терапевтических, так и для диагностических применений. Конъюгированные с антителом наночастицы и способы их получения и применения детально описаны в Arguebo, M., *et al.* 2009 (“Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications” в *J. Nanomat.* Том 2009, ID статьи 439389, 24 страницы, doi: 10.1155/2009/439389), включенной в данный документ посредством ссылки. Наночастицы для доставки лекарственных средств также были описаны, например, в US 8277812, US 8258256, US 8257740, US 8246995, US 8236330, каждая из которых в полном объеме включена в данный документ.

[0161] В определенных случаях фармацевтическая композиция может быть доставлена с помощью системы контролируемого высвобождения. В одном варианте реализации изобретения можно использовать насос. В другом варианте реализации изобретения можно использовать полимерные вещества. В еще одном варианте реализации изобретения система контролируемого высвобождения может быть помещена вблизи мишени композиции, благодаря чему требуется лишь часть системной дозы.

[0162] Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т. д. Такие инъекционные препараты можно получать с помощью общеизвестных способов. Например, инъекционные препараты можно получать, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования описанного выше антитела или его соли в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существуют, например, физиологический солевой раствор, изотоничный раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т. д., которые можно использовать в сочетании с соответствующим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т. д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т. д., которые можно использовать в сочетании с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т. д. Полученным таким образом инъекционным раствором предпочтительно заполняют соответствующую ампулу.

[0163] Фармацевтическая композиция по данному изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартных иглы и шприца. Кроме

того, что касается подкожной доставки, для доставки фармацевтической композиции по данному изобретению без труда можно использовать устройство для доставки в виде шприц-ручки. Такое устройство для доставки в виде шприц-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки в виде шприц-ручки обычно используется заменяемый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена, и картридж оказался пустым, пустой картридж без труда можно выбросить и заменить на новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После этого устройстве для доставки в виде шприц-ручки можно использовать повторно. В одноразовом устройстве для доставки в виде шприц-ручки нет заменяемого картриджа. Вместо этого одноразовое устройство для доставки в виде шприц-ручки выпускается предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После того как в резервуаре исчерпывается фармацевтическая композиция, устройство полностью выбрасывают.

[0164] Для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению можно использовать множество устройств для доставки в виде шприц-ручки и автоинжектора многоразового использования. Примеры включают без ограничения AUTOPEN® (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 Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN®, OPTIPEN® PRO, OPTIPEN® STARLET и OPTICLIK™ (Sanofi-aventis, Франкфурт, Германия) и многие другие. Примеры одноразовых устройств для доставки в виде шприц-ручки, которые можно применять для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению, включают без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR® (Sanofi-aventis), FLEXPEN® (Novo Nordisk) и KWIKPEN® (HUMALOG®), автоинжектор SURECLICK®, PENLET (Haselmeier, Штутгарт, Германия), шприц-ручку EPIPEN®, Mylan® и HUMIRA® (Abbott Labs, Эбботт-Парк, Иллинойс) и многие другие.

[0165] Преимущественно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения составляют в лекарственные формы с разовой дозой, подходящей для корректировки дозы активных ингредиентов. Такие лекарственные формы с разовой дозой включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекционные растворы (ампулы), суппозитории и т. д. Количество вышеуказанного содержащегося в них антитела обычно составляет от около 5 до около 500 мг на лекарственную форму с разовой дозой; в частности, в случае формы для инъекций является предпочтительным, чтобы вышеуказанное антитело содержалось в количестве от около 5 до около 100 мг, и от около 10 до около 250 мг для других лекарственных форм. Данное описание включает устройство для инъекций (например, предварительно наполненный

шприц или предварительно наполненный автоинжектор) или флакон (например, стеклянный или пластиковый флакон), содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению или фармацевтическую композицию на их основе, которая включает фармацевтически приемлемый носитель.

#### Терапевтические применения антител

[0166] В определенных вариантах реализации данного изобретения, антитела по данному изобретению являются пригодными для лечения легочной артериальной гипертензии или по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с легочной артериальной гипертензией. Антитела по данному изобретению также предусмотрены для профилактического применения у пациентов с риском развития легочной артериальной гипертензии. К таким пациентам относятся пожилые люди или пациенты с ослабленным иммунитетом из-за болезни или лечения иммунодепрессантами. Предполагается, что антитела по данному изобретению можно использовать отдельно или в сочетании со вторым средством или третьим средством для лечения легочной артериальной гипертензии или для ослабления по меньшей мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с легочной артериальной гипертензией. Второе или третье средства могут быть доставлены одновременно с антителами по данному изобретению, или они могут быть введены отдельно, либо до, либо после введения антител по данному изобретению. Пациент, который может получать антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению или фармацевтическую композицию на их основе, включает, например, животное, такое как млекопитающее, такое как человек (например, пожилой человек, например, в возрасте 65 лет или старше), кролик, мышь, крыса, корова, свинья, собака, примат, лошадь или овца.

[0167] В дополнительном варианте реализации данного изобретения, антитела по данному изобретению используют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих легочной артериальной гипертензией.

#### Комбинированные виды терапии

[0168] Данное описание включает композиции и терапевтические составы, содержащие любое из антител к PDGF-B, описанных в данном документе, в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающие введение таких комбинаций нуждающимся в этом пациентам.

[0169] Антитела к PDGF-B по данному изобретению можно составлять совместно с и/или вводить в комбинации, например, с антагонистом VEGF, например, «белком-ловушкой для VEGF», таким как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF слитый белок, представленный в US 7,087,41 1, антителом к VEGF или его антигенсвязывающим фрагментом (например, бевацизумаб, ранибизумаб), низкомолекулярным киназным ингибитором рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб) или антителом к рецептору VEGF. Антитело к PDGF-B также можно комбинировать с антагонистом PDGF-лиганда (например, антителом к PDGF-BB, антителом к PDGF-DD,

антителом к PDGF-CC, антителом к PDGF-AB или другим антагонистом PDGF-лиганда, таким как аптамер [например, аптамер к PDGF-B, такой как Fovista™, Ophthotech Corp., Принстон, Нью-Джерси], антисмысловой молекулой, рибозимом, siRNA, пептителом, наноантителом или фрагментом антитела, направленным против PDGF-лиганда). В других вариантах реализации изобретения антитела к PDGF-B по данному изобретению можно составлять совместно с и/или вводить в комбинации, например, с антагонистом EGFR (например, антителом к EGFR [например, цетуксимабом или панитумумабом] или низкомолекулярным ингибитором EGFR [например, gefитинибом или эрлотинибом]), антагонистом другого члена семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, антителом к ErbB2, ErbB3 или ErbB4 или низкомолекулярным ингибитором активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагонистом, специфическим в отношении EGFRvIII (например, антителом, которое специфически связывает EGFRvIII), антагонистом cMET (например, антителом к cMET), антагонистом IGF1 R (например, антителом к IGF1 R) или ингибитором B-raf (например, вемурафенибом, сорафенибом, GDC-0879, PLX-4720). В определенных случаях антитела к PDGF-B по данному изобретению комбинируют, совместно составляют и/или вводят в комбинации с ингибитором PDGFR-альфа (например, антителом к PDGFR-альфа), антагонистом DLL4 (например, антителом к DLL4, описанным в US 2009/0142354, таким как REGN421), антагонистом Ang2 (например, антителом к Ang2, описанным в US 2011/0027286, таким как H1 H685P) и т.п. Другие средства, которые можно успешно вводить в комбинации с антителами к PDGF-B по данному изобретению, включают ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 или с их соответствующими рецепторами.

[0170] Антитела к PDGF-B по данному изобретению также можно вводить и/или составлять в комбинации с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами, стероидами, кислородом, антиоксидантами, хелаторами, IFN-гамма и/или NSAID. Антитела к PDGF-B по данному изобретению также можно вводить как часть схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или традиционную химиотерапию (например, в контексте способов лечения рака или ингибирования роста опухоли).

[0171] Любые из вышеупомянутых дополнительных терапевтически активных компонентов можно вводить в комбинации с любыми из антител к PDGF-B по данному изобретению для лечения любого заболевания или нарушения, при которых введение антитела к PDGFR-бета является благоприятным, включая, например, любые из заболеваний глаза, фиброзирующих заболеваний, сосудистых заболеваний и/или форм рака, упоминаемых в данном документе. Например, в контексте лечения заболевания глаза (например, влажной формы AMD, диабетической ретинопатии, CRVO или любых других заболеваний глаза, описанных в данном документе), антитело к PDGF-B по данному изобретению можно составлять совместно с и/или вводить в комбинации с антагонистом VEGF, например, «белком-ловушкой для VEGF», таким как афлиберцепт или другой

ингибирующий VEGF слитый белок, представленный в US 7,087,41 1, или антителом к VEGF или его антигенсвязывающим фрагментом (например, бевацизумабом или ранибизумабом).

[0172] В типовых вариантах реализации изобретения, в которых антитело к PDGF-B по данному изобретению вводят в комбинации с антагонистом VEGF (например, белком-ловушкой для VEGF, таким как афлиберцепт), включая введение комбинированных составов, содержащих антитело к PDGF-B и антагонист VEGF, пациенту можно вводить отдельные компоненты и/или их можно совместно составлять, используя ряд комбинаций дозировок. Например, антитело к PDGF-B можно вводить пациенту и/или оно может содержаться в комбинированном составе в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,05 мг, 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1,0 мг, 1,5 мг, 2,0 мг, 2,5 мг, 3,0 мг, 3,5 мг, 4,0 мг, 4,5 мг, 5,0 мг и 5,5 мг; и антагонист VEGF (например, белок-ловушка для VEGF, такой как афлиберцепт) можно вводить пациенту и/или оно может содержаться в комбинированном составе в количестве, выбранном из группы, состоящей из 1,0 мг, 1,1 мг, 1,2 мг, 1,3 мг, 1,4 мг, 1,5 мг, 1,6 мг, 1,7 мг, 1,8 мг, 1,9 мг, 2,0 мг, 2,1 мг, 2,2 мг, 2,3 мг, 2,4 мг, 2,5 мг, 2,6 мг, 2,7 мг, 2,8 мг, 2,9 мг и 3,0 мг. Иллюстративные комбинации дозировок антитела к PDGF-B/афлиберцепта по данному изобретению включают, например, следующее: (i) 0,2 мг антитела к PDGF-B+2 мг афлиберцепта; (ii) 0,5 мг антитела к PDGF-B+2 мг афлиберцепта; (iii) 1 мг антитела к PDGF-B+2 мг афлиберцепта; (iv) 3 мг антитела к PDGF-B+2 мг афлиберцепта; и (v) 4 мг антитела к PDGFR-бета+2 мг афлиберцепта. Комбинации/комбинированные составы можно вводить пациенту согласно любой из схем введения, описанных в другом месте данного документа, включая, например, введение один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 3 месяца, один раз в 4 месяца, один раз в 5 месяцев, один раз в 6 месяцев и т.д.

[0173] Дополнительный(дополнительные) терапевтически активный(активные) компонент(компоненты) можно вводить пациенту до введения антитела к PDGF-B по данному изобретению. Например, можно считать, что первый компонент вводят «до» введения второго компонента, если первый компонент вводят за 1 неделю до, за 72 часа до, за 60 часов до, за 48 часов до, за 36 часов до, за 24 часа до, за 12 часов до, за 6 часов до, за 5 часов до, за 4 часа до, за 3 часа до, за 2 часа до, 1 час до, за 30 минут до, за 15 минут до, за 10 минут до, за 5 минут до или менее чем за 1 минуту до введения второго компонента. В других вариантах реализации изобретения дополнительный(дополнительные) терапевтически активный(активные) компонент(компоненты) можно вводить пациенту после введения антитела к PDGF-B по данному изобретению. Например, можно считать, что первый компонент вводят «после» введения второго компонента, если первый компонент вводят через 1 минуту после, через 5 минут после, через 10 минут после, через 15 минут после, через 30 минут после, через 1 час после, через 2 часа после, через 3 часа после, через 4 часа после, через 5 часов после, через 6 часов после, через 12 часов после, через 24 часа после, через 36 часов после, через 48 часов после, через 60 часов после, через

72 часа после введения второго компонента. В еще одних вариантах реализации изобретения дополнительный(дополнительные) терапевтически активный(активные) компонент(компоненты) можно вводить пациенту одновременно с введением антитела к PDGF-B.

[0174] «Одновременное» введение, для целей данного изобретения, включает, например, введение антитела к PDGF-B и дополнительного терапевтически активного компонента пациенту в единой лекарственной форме (например, в виде комбинированного состава), или в отдельных лекарственных формах, вводимых пациенту с разницей в около 30 минут или меньше друг от друга. При введении в отдельных лекарственных формах, каждую лекарственную форму можно вводить одним и тем же путем (например, как антитело к PDGFR-бета, так и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить в стекловидное тело, подкожно и т.д.); в альтернативном варианте, каждую лекарственную форму можно вводить другим путем (например, антитело к PDGF-B можно вводить в стекловидное тело, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить системно). Для целей данного изобретения любой из случаев, введение компонентов в единой лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах одним и тем же путем или в отдельных лекарственных формах разными путями, считают «одновременным введением». Для целей данного изобретения введение антитела к PDGF-B «до», «одновременно с» или «после» (как эти термины определены в данном документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считают введением антитела к PDGF-B «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом.

[0175] Данное описание включает фармацевтические композиции, в которых антитело к PDGFR-бета по данному изобретению составлена совместно с одним или несколькими из дополнительных терапевтически активных компонентов, как описано в другом месте данного документа.

[0176] Данное описание также включает дополнительные терапевтические композиции, содержащие комбинацию антагониста PDGF и антагониста VEGF. Антагонисты PDGF согласно этому аспекту данного изобретения включают антагонисты рецептора PDGF, а также антагонисты PDGF-лиганда. Аналогично, антагонисты VEGF согласно этому аспекту данного изобретения включают антагонисты рецептора VEGF, а также антагонисты VEGF-лиганда.

[0177] Дополнительный(дополнительные) терапевтически активный(активные) компонент(компоненты) можно вводить до, одновременно или после введения антитела к PDGF-B по данному изобретению. Для целей данного изобретения, такие схемы введения предусматривают введение антитела к PDGF-B «в комбинации с» одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами.

#### Диагностические применения антител

[0178] Антитела к PDGF-B по данному изобретению можно также использовать для выявления и/или измерения PDGF-B в образце, например, в диагностических целях.

Иллюстративные диагностические анализы для PDGF-B могут включать, например, приведение образца, полученного от пациента, в контакт с антителом к PDGF-B по данному изобретению, причем антитело к PDGF-B метят с помощью детектируемой метки или репортерной молекулы или используют в качестве лиганда захвата для избирательного выделения PDGF-B из образцов от пациента. В качестве альтернативы, немеченное антитело к PDGF-B можно использовать для диагностических применений в комбинации со вторичным антителом, которое является меченым для возможности выявления. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может быть радиоизотопом, таким как  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  или  $^{125}\text{I}$ ; флуоресцентным или хемилюминесцентным фрагментом, таким как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или ферментом, таким как щелочная фосфатаза,  $\beta$ -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для выявления или измерения PDGF-B в образце, включают ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

[0179] Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах в отношении PDGF-B согласно данному изобретению, включают любой образец ткани или жидкости организма, который можно получить от пациента, который содержит выявляемые количества либо PDGF-B, либо его фрагментов, при нормальных или патологических состояниях. В целом, уровни PDGF-B в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, который не страдает легочной артериальной гипертензией), будут измерять сначала для установления исходного, или стандартного, уровня PDGF-B. Этот исходный уровень PDGF-B затем можно сравнивать с уровнями PDGF-B, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие состояния, связанного с легочной артериальной гипертензией, или симптомами, ассоциированными с таким состоянием.

[0180] Специфические в отношении PDGF-B антитела могут не содержать дополнительных меток или соединений, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или соединение. В одном варианте реализации изобретения метка или соединение представляет собой биотин. В анализе связывания, расположение метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида по отношению к поверхности, на которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет расположен так, что C-концевая часть пептида будет отдалена от поверхности. В некоторых вариантах реализации изобретения метка может представлять собой выявляемую метку, такую как радиоизотоп, флуоресцентный краситель или MRI-выявляемая метка. Выявляемые метки могут быть связаны с антителами, причем такие антитела можно использовать в анализах с визуализацией.

#### Способы лечения

[0181] Данное описание относится к способам лечения пациента, имеющего легочную артериальную гипертензию. В целом, способы включают введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела к PDGF-B или его

антигенсвязывающего фрагмента.

[0182] В некоторых аспектах, введение антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента обеспечивает ингибирование утолщения легочной артерии у пациента, например, ингибирование дальнейшего утолщения легочной артерии у пациента относительно исходного уровня, например, при постановке диагноза. Утолщение легочной артерии можно определять, например, с помощью КТ грудной клетки (например, аксиальные 10 мм КТ-срезы без контраста) и использовать ее значения для расчета диаметра ствола легочной артерии (mPA). Диаметр ствола легочной артерии у здоровых пациентов составляет от около 2,4 см до около 3,0 см. Диаметр ствола легочной артерии у пациентов с легочной артериальной гипертензией составляет от около 3,1 см до около 3,8 см или больше. См., например, Edwards, *et al.* (1998) *Br J Radiol* 71(850):1018-20.

[0183] В других аспектах, введение антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента обеспечивает повышение ударного объема и/или соотношения ударного объема и конечного систолического объема («SV/ESV») у пациента. «Ударный объем» («SV») представляет собой объем крови, прокачиваемой из правого или левого желудочка за одно сокращение. Ударный объем можно рассчитать, используя измерения значений объема желудочка по эхокардиограмме, и рассчитать путем вычитания объема крови в желудочке в конце сокращения (называемого «конечным систолическим объемом», «EDV») из объема крови непосредственно перед сокращением (так называемый «конечный диастолический объем», «ESV»). Ударный объем также можно рассчитать, например, как сердечный выброс, измеренный с помощью термодилуционного метода в ходе катетеризации правых отделов сердца, разделенный на частоту сердечных сокращений, или как EDV минус ESV и индексированное для площади поверхности тела. Термин «ударный объем» может быть применен для каждого из двух желудочков сердца. Значения ударного объема для каждого желудочка обычно равны, при этом оба составляют примерно 70 мл у здоровых людей. SV/ESV для здоровых пациентов составляет от около 0,9 до около 2,2, а SV/ESV для пациентов, у которых наблюдается ПАН, составляет от около 0,2 до около 0,9. См., например, Brewis, *et al.* (2016) *Int J Cardiol* 218:206-211.

[0184] В еще одних аспектах, введение антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента обеспечивает у пациента увеличение сердечного выброса для правого желудочка и/или сердечного индекса (CI). «Сердечный выброс» («CO») определяется как количество крови, прокачиваемое желудочком за единицу времени. «Сердечный индекс» («CI») является гемодинамическим параметром, который относится к сердечному выбросу (CO) для левого желудочка за одну минуту с «площадью поверхности тела» («BSA»), тем самым связывая работу сердца с размерами человека. Эхокардиографические методы и методы радионуклидной визуализации можно использовать для оценки изменений размеров желудочков в реальном времени, таким образом вычисляя ударный объем, который при умножении на частоту сердечных сокращений дает сердечный выброс, а BSA может быть рассчитан с использованием любой из формул, известных специалисту в данной области техники, включая, например, формулу

Дюбуа (Verbraecken, J, *et al.* (2006) *Metabolism - Clin Exper* 55(4):515-24) или формулу Мостеллера (Mosteller (1987) *N Engl J Med* 317:1098). У пациентов, у которых нет РАН, наблюдается сердечный выброс в диапазоне около 4,0-8,0 л/мин и сердечный индекс от около 2,6 до около 4,2 л/минута на квадратный метр. У пациентов, у которых есть РАН, наблюдается сердечный индекс от около 1,9 до около 2,3 л/минута на квадратный метр (Ryan and Archer (2016) *Circ Res* 115:176-188).

[0185] Введение антитела к PDGF-В или его антигенсвязывающего фрагмента пациенту, у которого наблюдается РАН, в способах по данному изобретению может обеспечивать улучшение других гемодинамических измерений у пациента, у которого наблюдается РАН, таких как, например, давление в правом предсердии, давление в легочной артерии, давление заклинивания легочных капилляров в присутствии давления в конце выдоха, давление в системных артериях, сердечное сокращение, сопротивление легочных сосудов и/или системное сосудистое сопротивление. Способы и устройства для измерения давления в правом предсердии, давления в легочной артерии, давления заклинивания легочных капилляров в присутствии давления в конце выдоха, давления в системных артериях, сердечного сокращения, сопротивления легочных сосудов и/или системного сосудистого сопротивления известны специалисту в данной области техники.

[0186] У пациентов, у которых нет РАН, наблюдается давление в правом предсердии от около 1 мм рт. ст до около 5 мм рт. ст; у пациентов, у которых есть РАН, наблюдается давление в правом предсердии от около 11 мм рт. ст до около 13 мм рт. ст.

[0187] У пациентов, у которых нет РАН, наблюдается давление в легочной артерии от около 9 мм рт. ст до около 20 мм рт. ст; у пациентов, у которых есть РАН, наблюдается давление в легочной артерии от около 57 мм рт. ст до около 61 мм рт. ст.

[0188] У пациентов, у которых нет РАН, наблюдается давление заклинивания легочных капилляров в присутствии давления в конце выдоха от около 4 мм рт. ст до около 12 мм рт. ст; у пациентов, у которых есть РАН, наблюдается давление заклинивания легочных капилляров в присутствии давления в конце выдоха от около 9 мм рт. ст до около 11 мм рт. ст.

[0189] У пациентов, у которых нет РАН, наблюдается давление в системных артериях от около 90 мм рт. ст до около 96 мм рт. ст; у пациентов, у которых есть РАН, наблюдается давление в системных артериях от около 87 мм рт. ст до около 91 мм рт. ст.

[0190] У пациентов, у которых нет РАН, наблюдается сердечное сокращение от около 60 ударов в минуту (уд/мин) до около 90 уд/мин; у пациентов, у которых есть РАН, наблюдается давление в системных артериях от около 84 уд/мин до 88 уд/мин.

[0191] У пациентов, у которых нет РАН, наблюдается сопротивление легочных сосудов от около 20 дин·с/см<sup>5</sup> до около 130 дин с/см<sup>5</sup> (или от около 0,25 до около 1,625 единиц Вуда); у пациентов, у которых есть РАН, наблюдается сопротивление легочных сосудов от около 1200 дин с/см<sup>5</sup> до около 1360 дин с/см<sup>5</sup> (или от около 15 до около 17 единиц Вуда).

[0192] У пациентов, у которых нет РАН, наблюдается системное сосудистое

сопротивление от около 700 дин·с/см<sup>5</sup> до около 1600 дин с/см<sup>5</sup> (или от около 9 до около 20 единиц Вуда); у пациентов, у которых есть РАН, наблюдается системное сосудистое сопротивление от около 1840 дин с/см<sup>5</sup> до около 2000 дин с/см<sup>5</sup> (или от около 23 до около 25 единиц Вуда).

[0193] Способы по данному изобретению могут также обеспечивать улучшение других клинических параметров, таких как функция легких, у подлежащего лечению пациента. Например, в ходе или после периода лечения у пациента может наблюдаться повышенная переносимость физической нагрузки или активности, как измерено с помощью, например, теста по определению дистанции 6-минутной ходьбы (6 MWD) или измерения активности, или снижение индекса выраженности диспноэ Борга (BDI).

[0194] Способы по данному изобретению могут также обеспечивать улучшение одного или нескольких параметров качества жизни относительно исходного уровня, например, повышение балла по меньшей мере по одной функциональной шкале в опроснике для оценки качества жизни SF-36®; улучшение относительно исходного уровня в отношении тяжести состояния, например, за счет перемещения к меньшему функциональному классу ВОЗ; и/или повышенную продолжительность жизни.

[0195] Любое подходящее измерение переносимости физической нагрузки может быть использовано для определения того, наблюдается ли у пациента повышенная переносимость физической нагрузки или активности. Одним из подходящих измерений является тест с 6-минутной ходьбой (6MWT), в котором измеряют, сколько может пройти пациент за 6 минут, т. е. дистанцию 6-минутной ходьбы (6MWD). Другим подходящим измерением является индекс выраженности диспноэ Борга (BDI), который представляет собой числовую шкалу для оценки воспринимаемого диспноэ (испытываемый при дыхании дискомфорт). С помощью этого показателя измеряют степень одышки после завершения теста с 6-минутной ходьбой (6MWT), где BDI 0 указывает на отсутствие одышки и 10 указывает на максимальную степень одышки. В одном варианте реализации изобретения способы по данному изобретению обеспечивают у пациента повышение относительно исходного уровня 6MWD на по меньшей мере около 10 минут, например, на около 10, 15, 20 или около 30 минут. В другом варианте реализации изобретения после 6MWT, способы по данному изобретению обеспечивают у пациента снижение, относительно исходного уровня BDI, на значение, составляющее от по меньшей мере около 0,5 до около 1,0 точки индекса.

[0196] Можно использовать любое подходящее измерение качества жизни. Например, опросник для оценки качества жизни SF-36® обеспечивает сообщаемую пациентом, многоэлементную шкалу, измеряющую восемь параметров здоровья: физическое функционирование, ролевое функционирование, обусловленное физическим состоянием, интенсивность боли, общее состояние здоровья, жизненная активность (энергичность и утомляемость), социальные функционирование, ролевое функционирование, обусловленное эмоциональным состоянием, и психическое здоровье (психологический стресс и психологическое благополучие). Опросник также обеспечивает

индекс физического здоровья и индекс психического здоровья. В одном варианте реализации способы по данному изобретению обеспечивают у пациента улучшение относительно исходного уровня в отношении по меньшей мере одного из параметров SF-36, связанных с физическим здоровьем (физическое здоровье, ролевое функционирование, обусловленное физическим состоянием, интенсивность боли и/или общее состояние здоровья), и/или в отношении по меньшей мере одного из параметров SF-36, связанных с психическим здоровьем (жизненная активность, социальные функционирование, ролевое функционирование, обусловленное эмоциональным состоянием, и/или психическое здоровье). Такое улучшение может принимать форму повышения на по меньшей мере 1, например, на по меньшей мере 2 или на по меньшей мере 3 балла по шкале для любого одного или нескольких параметров.

[0197] Способы по данному изобретению могут также обеспечивать улучшение прогноза у подлежащего лечению пациента. Например, способы по данному изобретению могут обеспечивать у пациента снижение вероятности явления клинического ухудшения в ходе периода лечения и/или снижение, относительно исходного уровня, концентрации сывороточного натрийуретического пептида головного мозга (BNP) или NT-pro-BNP или его N-концевого прогормона, NT-pro-BNP, причем, на исходном уровне, промежуток времени с момента первой постановки диагноза состояния у пациента не превышает около 2 лет.

[0198] Промежуток времени с момента первой постановки диагноза, в различных аспектах, может составлять, например, не более чем около 1,5 года, не более чем около 1 года, не более чем около 0,75 года или не более чем около 0,5 года. Явление клинического ухудшения (CWE) включает смерть, трансплантацию легких, госпитализацию по поводу РАН, предсердную септостомию, начало дополнительной терапии легочной гипертензии или их комбинацию. Время до клинического ухудшения РАН определяется как промежуток времени с момента начала лечения до первого возникновения CWE.

[0199] В одном варианте реализации способы по данному изобретению обеспечивают снижение концентрации BNP или NT-pro-BNP, относительно исходного уровня, составляющее по меньшей мере около 15%, например, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 50% или по меньшей мере около 75%.

[0200] В одном варианте реализации, способы по данному изобретению обеспечивают снижение вероятности смерти, трансплантации легких, госпитализации по поводу легочной артериальной гипертензии, предсердной септостомии и/или начала дополнительной терапии легочной гипертензии в ходе периода лечения на по меньшей мере около 25%, например, на по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 75%> или по меньшей мере около 80%.

[0201] Способы по данному изобретению также могут обеспечить продление жизни (продление времени выживания) пациента, у которого наблюдается РАН, относительно момента начала лечения, например, на по меньшей мере около 30 суток.

[0202] Терапевтически эффективное количество антитела к PDGF-B или его

антигенсвязывающего фрагмента для применения в способах по данному изобретению может составлять от около 0,05 мг до около 600 мг; например, около 0,05 мг, около 0,1 мг, около 1,0 мг, около 1,5 мг, около 2,0 мг, около 10 мг, около 20 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг, около 90 мг, около 100 мг, около 110 мг, около 120 мг, около 130 мг, около 140 мг, около 150 мг, около 160 мг, около 170 мг, около 180 мг, около 190 мг, около 200 мг, около 210 мг, около 220 мг, около 230 мг, около 240 мг, около 250 мг, около 260 мг, около 270 мг, около 280 мг, около 290 мг, около 300 мг, около 310 мг, около 320 мг, около 330 мг, около 340 мг, около 350 мг, около 360 мг, около 370 мг, около 380 мг, около 390 мг, около 400 мг, около 410 мг, около 420 мг, около 430 мг, около 440 мг, около 450 мг, около 460 мг, около 470 мг, около 480 мг, около 490 мг, около 500 мг, около 510 мг, около 520 мг, около 530 мг, около 540 мг, около 550 мг, около 560 мг, около 570 мг, около 580 мг, около 590 мг, около 600 мг, около 610 мг, около 620 мг, около 630 мг, около 640 мг, около 650 мг, около 660 мг, около 670 мг, около 680 мг, около 690 мг, около 700 мг, около 710 мг, около 720 мг, около 730 мг, около 740 мг, около 750 мг, около 760 мг, около 770 мг, около 780 мг, около 790 мг, около 800 мг, около 810 мг, около 820 мг, около 830 мг, около 840 мг, около 850 мг, около 860 мг, около 870 мг, около 880 мг, около 890 мг, около 900 мг, около 910 мг, около 920 мг, около 930 мг, около 940 мг, около 950 мг, около 960 мг, около 970 мг, около 980 мг, около 990 мг или около 1000 мг соответствующего антитела.

[0203] Количество антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащегося в отдельной дозе, может быть выражено в миллиграммах антитела на килограмм массы тела пациента (т.е. мг/кг). Например, антитело к PDGF-B или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить пациенту в дозе от около 0,0001 до около 50 мг/кг массы тела пациента (например, 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,5 мг/кг, 10,0 мг/кг, 10,5 мг/кг, 11,0 мг/кг, 11,5 мг/кг, 12,0 мг/кг, 12,5 мг/кг, 13,0 мг/кг, 13,5 мг/кг, 14,0 мг/кг, 14,5 мг/кг, 15,0 мг/кг, 15,5 мг/кг, 16,0 мг/кг, 16,5 мг/кг, 17,0 мг/кг, 17,5 мг/кг, 18,0 мг/кг, 18,5 мг/кг, 19,0 мг/кг, 19,5 мг/кг, 20,0 мг/кг и т.д.).

[0204] Многократные дозы антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции, содержащей антитело к PDGF-B или его антигенсвязывающий фрагмент, можно вводить пациенту в течение определенного промежутка времени. Способы согласно этому аспекту данного изобретения включают последовательное введение пациенту многократных доз активного ингредиента по данному изобретению. В контексте данного документа «последовательное введение» означает, что каждая доза активного ингредиента вводится пациенту в разные моменты времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, в часы, дни, недели или месяцы). Данное описание включает способы, которые включают последовательное введение пациенту единичной начальной дозы активного ингредиента, с последующим введением одной или нескольких доз второй очереди активного ингредиента, и

необязательно с последующим введением одной или нескольких доз третьей очереди активного ингредиента.

[0205] Термины «начальная доза», «дозы второй очереди» и «дозы третьей очереди» относятся к временной последовательности введения антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента или комбинированного терапевтического препарата по данному изобретению. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которую вводят вначале курса лечения (также называется «исходной дозой»); «дозы второй очереди» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «дозы третьей очереди» представляют собой дозы, которые вводят после доз второй очереди. Начальная доза, дозы второй и третьей очереди могут содержать одинаковое количество антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента, но в целом могут отличаться друг от друга с учетом частоты введения. Однако, в определенных вариантах реализации изобретения количество антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащееся в начальной дозе, дозах второй и третьей очереди, отличаются друг от друга (например, по мере необходимости скорректированы по возрастающей или по убывающей) в ходе курса лечения. В определенных вариантах реализации изобретения две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят вначале курса лечения в качестве «нагрузочных доз», с последующими дозами, которые вводят реже (например, «поддерживающие дозы»).

[0206] В определенных типовых вариантах реализации данного изобретения каждую дозу второй и/или третьей очереди вводят через 1-26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, или более) недель после ближайшей предшествующей дозы. Фраза «ближайшая предшествующая доза» в контексте данного документа означает, в случае последовательности многократных введений, дозу антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента, которую вводят пациенту до введения следующей дозы, в случае последовательности без промежуточных доз.

[0207] Способы согласно этому аспекту данного изобретения могут включать введение пациенту любого числа доз второй и/или третьей очереди. Например, в определенных вариантах реализации изобретения пациенту вводят только одну дозу второй очереди. В других вариантах реализации изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) доз второй очереди. Аналогично, в определенных вариантах реализации изобретения пациенту вводят только одну дозу третьей очереди. В других вариантах реализации изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) доз третьей очереди.

[0208] В вариантах осуществления изобретения, включающих многократные дозы второй очереди, каждую дозу второй очереди можно вводить с той же частотой, что и другие дозы второй очереди. Например, каждую дозу второй очереди можно вводить пациенту через 1-2 недели или 1-2 месяца после ближайшей предшествующей дозы. Аналогичным образом, в вариантах осуществления изобретения, включающих

многократные дозы третьей очереди, каждую дозу третьей очереди можно вводить с той же частотой, что и другие дозы третьей очереди. Например, каждую дозу третьей очереди можно вводить пациенту через 2-12 недель после ближайшей предшествующей дозы. В определенных вариантах реализации данного изобретения частота, с которой дозы второй и/или третьей очереди вводят пациенту, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения также может быть скорректирована врачом в ходе курса лечения в зависимости от потребностей отдельного пациента, участвующего в клиническом исследовании.

[0209] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к PDGF-B или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в качестве монотерапии (т. е. в качестве единственного терапевтического средства). В других вариантах реализации изобретения антитело к PDGF-B или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами.

[0210] В комбинированных способах, которые включают введение пациенту антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, антитело и дополнительное терапевтическое средство можно вводить пациенту в одно и то же или по существу в одно и то же время, например, в одной терапевтической дозировке, или в двух отдельных дозировках, которые вводят одновременно или в пределах менее чем около 5 минут друг от друга. В альтернативном варианте, антитело и дополнительное терапевтическое средство можно вводить пациенту последовательно, например, в отдельных терапевтических дозировках, разделенных во времени друг от друга более чем на около 5 минут.

[0211] Соответственно, в одном варианте реализации изобретения способы дополнительно включают введение терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного терапевтического средства, выбранного из группы, состоящей из антикоагулянта, диуретика, сердечного гликозида, блокатора кальциевых каналов, сосудорасширяющего средства, аналога простаглицина, антагониста эндотелина, ингибитора фосфодиэстеразы, ингибитора эндопептидазы, гиполипидемического средства и ингибитора тромбксана. В одном варианте реализации изобретения способы по данному изобретению дополнительно включают введение терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного или нескольких дополнительных терапевтических антител или антител или его(их) антигенсвязывающего фрагмента или фрагментов. В одном варианте реализации изобретения одно или несколько дополнительных антител или антител выбраны из группы, состоящей из антитела или антител к Grem 1, антитела или антител к PDGFR $\beta$ , антитела или антител к TLR4, антитела или антител к TLR2, антитела или антител к EDN1 и антитела или антител к ASIC1.

[0212] Примеры подходящих антикоагулянтов включают без ограничения, например, варфарин, пригодный в лечении пациентов с легочной гипертензией, у которых наблюдается повышенный риск развития тромбоза и тромбоземболии.

[0213] Примеры подходящих блокаторов кальциевых каналов включают без

ограничения дилтиазем, фелодипин, амлодипин и нифедипин.

[0214] Подходящие сосудорасширяющие средства включают без ограничения, например, простациклин, эпопростенол, трепростинил и оксид азота (NO).

[0215] Подходящие иллюстративные ингибиторы фосфодиэстеразы включают без ограничения, в частности, ингибиторы фосфодиэстеразы V, такие как, например, тадалафил, силденафил и варденафил.

[0216] Примеры подходящих антагонистов эндотелина включают без ограничения, например, бозентан и ситаксентан.

[0217] Подходящие аналоги простациклина включают без ограничения, например, иломедин, трепростинил и эпопростенол.

[0218] Подходящие гиполипидемические средства включают без ограничения, например, ингибиторы HMG-CoA-редуктазы, такие как симвастатин, правастатин, аторвастатин, ловастатин, итавастатин, флувастатин, питавастатин, розувастатин, ZD-4522 и церивастатин.

[0219] Диуретики, подходящие для применения в комбинированных видах терапии по данному изобретению, включают без ограничения, например, хлорталидон, индапамид, бендрофлуметиазид, метолазон, циклопентиазид, политиазид, мефрузид, ксипамид, хлортиазид и гидрохлортиазид.

[0220] Примеры других терапевтических средств включают без ограничения, например, ингибиторы ACE, такие как эналаприл, рамиприл, каптоприл, цилазаприл, трандолаприл, фозиноприл, хинаприл, мозексиприл, лизиноприл и периндоприл, или ингибиторы АП II, такие как лозартан, кандесартан, ирбесартан, эмбусартан, валсартан и телмисартан, или илопрост, бетапрост, L-аргинин, омапатрилат, кислород и/или дигоксин.

[0221] Способы могут также включать комбинированное применение ингибиторов киназ (например, BMS-354825, канертиниб, эрлотиниб, gefитиниб, иматиниб, лапатиниб, лестауртиниб, лонафарниб, пегаптаниб, пелитиниб, семаксаниб, тандутиниб, типифарниб, ваталаниб, лонидамин, фасудил, лефлуномид, бортезомиб, иматиниб, эрлотиниб и Glivec) и/или ингибиторов эластазы.

[0222] Дополнительный(дополнительные) терапевтически активный(активные) компонент(компоненты) можно вводить пациенту до введения антитела к PDGF-B. Например, можно считать, что первый компонент вводят «до» введения второго компонента, если первый компонент вводят за 1 неделю до, за 72 часа до, за 60 часов до, за 48 часов до, за 36 часов до, за 24 часа до, за 12 часов до, за 6 часов до, за 5 часов до, за 4 часа до, за 3 часа до, за 2 часа до, 1 час до, за 30 минут до, за 15 минут до, за 10 минут до, за 5 минут до или менее чем за 1 минуту до введения второго компонента. В других вариантах реализации изобретения дополнительный(дополнительные) терапевтически активный(активные) компонент(компоненты) можно вводить пациенту после введения антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, можно считать, что первый компонент вводят «после» введения второго компонента, если первый компонент вводят через 1 минуту после, через 5 минут после, через 10 минут после, через

15 минут после, через 30 минут после, через 1 час после, через 2 часа после, через 3 часа после, через 4 часа после, через 5 часов после, через 6 часов после, через 12 часов после, через 24 часа после, через 36 часов после, через 48 часов после, через 60 часов после, через 72 часа после введения второго компонента.

[0223] В еще одних вариантах реализации изобретения дополнительный(дополнительные) терапевтически активный(активные) компонент(компоненты) можно вводить пациенту одновременно с введением антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению. «Одновременное» введение, для целей данного изобретения, включает, например, введение антитела к PDGF-B и дополнительного терапевтически активного компонента пациенту в единой лекарственной форме, или в отдельных лекарственных формах, вводимых пациенту с разницей в около 30 минут или меньше друг от друга. При введении в отдельных лекарственных формах, каждую лекарственную форму можно вводить одним и тем же путем (например, как антитело к PDGF-B, так и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно, подкожно, в стекловидное тело и т.д.); в альтернативном варианте, каждую лекарственную форму можно вводить другим путем (например, антитело к PDGF-B можно вводить местно (например, в стекловидное тело), а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить системно). Для целей данного изобретения любой из случаев, введение компонентов в единой лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах одним и тем же путем или в отдельных лекарственных формах разными путями, считают «одновременным введением». Для целей данного изобретения введение антитела к PDGF-B «до», одновременно с, или «после» (как эти термины определены в данном документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считают введением антитела к PDGF-B или его антигенсвязывающего фрагмента «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом.

#### ПРИМЕРЫ

[0224] Следующие примеры приведены с целью предоставления специалистам в данной области техники полного раскрытия и описания того, как выполнять и применять способы и композиции по данному изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы данного изобретения рассматривают как свое изобретение. Если не указано иное, части являются частями по массе, молекулярная масса представляет собой средневзвешенную молекулярную массу, температура приводится в градусах по Цельсию, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

[0225] Термины REGN13335 и H4H13145P в данном документе используются взаимозаменяемо. Кроме того, термины REGN15171 и H4H13132P в данном документе используются взаимозаменяемо.

Пример 1. Скрининг и *in-vitro* определение характеристик антител к PDGF

[0226] Для выделения и первичного скрининга антител к PDGF-B использовали мышей Adam6/VI-3, ULC1633 и ULC1635. Соображения включали необходимость

перекрестно связывающихся антител обезьян и мышей, а также требовали блокирования передачи сигналов с участием PDGF-BB и PDGF-AB. Перекрестное связывание с DD считалось крайне маловероятным, и дополнительно не ожидалось перекрестной реактивности с PDGF AA. Поликлональное нейтрализующее антитело козы к PDGFBB человека AF-220-NA использовали в качестве контроля/антитела сравнения.

[0227] PES-отсортированные В-клетки были выделены у 12 мышей. Мышей Adam6/VI-3, ULC1633 и ULC1635 использовали для сортировки по антигену биотин-hPDGFBB или mPDGFBB, и собирали 6387 В-клеток. Обработывали одиннадцать планшетов с В-клетками (3614 В-клеток), и VH амплифицировали только для мышей ULC. В общей сложности 1056 ПЦР-пар клонировали в плазмиды hIgG1 BST. Первичный скрининг в отношении Ag<sup>+</sup> образцов осуществляли с помощью ELISA. В общей сложности идентифицировали 854 Ag<sup>+</sup> (81%) образцов (>1000 MFI для hPDFGBB (Peprotech)). Вторичный скрининг осуществляли в отношении Ag<sup>+</sup> образцов путем применения ELISA с блокированием, Lumindex, Viacore и биологического анализа с блокированием. Перекрестно связывающиеся антитела мыши анализировали путем применения Viacore и биологического анализа для мыши. Результаты скрининга моноклональных антител от мышей VI-3 обобщены на **Фигуре 1** и в **таблице 1** ниже.

**Таблица 1.** Результаты скрининга моноклональных антител от мышей VI-3.

Антитело	Линия	Группа	KD [M]	t <sub>1/2</sub> (мин)	Биологический анализ с блокированием (%)	Lumindex с блокированием (h) (%)	% блокирования в Lumindex (m) (%)	ELISA с блокированием (h) (%)
H4H13163B	Adam6/VI3	3	4,60E-11	≥ 116	61,9	96,7	96,9	-7,2
H4H13151B	Adam6/VI3	5	6,49E-10	2,8	67,3	80,2	73,0	13,6
H4H13132B	Adam6/VI3	3	9,59E-11	≥ 116	68,2	88,1	88,8	14,1
H4H13143B	Adam6/VI3	5	1,71E-10	20,3	68,6	76,7	84,2	11,3
H4H13153B	Adam6/VI3	2	6,55E-10	1,8	70,0	87,3	87,4	7,1
H4H13169B	Adam6/VI3	3	4,86E-10	3,3	70,2	85,1	82,7	0,0
H4H13159B	Adam6/VI3	5	1,10E-10	26,5	71,2	87,0	89,3	5,5
H4H13157B	Adam6/VI3	3	6,45E-10	3,6	73,2	98,3	98,3	8,2
H4H13155B	Adam6/VI3	5	1,25E-10	36,1	74,4	88,5	71,6	10,7
H4H13170B	Adam6/VI3	4	5,82E-10	18,5	79,0	45,8	3,1	0,0
H4H13162B	Adam6/VI3	5	2,81E-11	≥ 116	81,4	94,2	94,7	9,3
H4H13166B	Adam6/VI3	4	5,97E-11	≥ 116	87,1	36,1	0,0	0,9
H4H13167B	Adam6/VI3	4	7,87E-11	≥ 116	89,2	22,8	0,0	0,0

H4H13127B	Adam6/VI3	5	3,54E-11	≥ 116	94,3	3,9	6,5	11,8
H4H13152B	Adam6/VI3	5	1,56E-09	3,7	100,0	51,2	49,8	9,1
H4H13145B	Adam6/VI3	5	6,43E-11	≥ 116	100,0	64,8	73,1	59,1
H4H13148B	Adam6/VI3	5	2,94E-11	≥ 116	110,2	95,1	25,6	52,2

[0228] Равновесные константы диссоциации (значения  $K_D$ ) для связывания PDGF-B человека и мыши с очищенными моноклональными антителами к PDGF-B по данному изобретению определяли, используя биосенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для исследований в режиме реального времени, MASS-1. Все исследования по связыванию осуществляли в подвижном буфере с 10 mM HEPES, 300 mM NaCl, 3 mM EDTA, 1 мкг/мл гепарина и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, уровень pH 7,4 (HBS-T), при 25°C и 37 °C (**фигура 2**). Поверхность HSA-сенсора сперва дериватизировали путем сочетания по аминокгруппе моноклонального антитела мыши к Fc человека (GE, № BR100839), и моноклональные антитела к PDGF-B были индивидуально захвачены. Путем впрыскивания разных концентраций PDGF-B человека (hPDGF-B; 50 нМ, 12,5 нМ, 3,125 нМ) или PDGF-B мыши (mPDGF-B; 50 нМ, 12,5 нМ, 3,125 нМ), приготовленных в подвижном буфере HBS-EHT, покрывали поверхность с захваченным моноклональным антителом к PDGF-B в течение 4 минут при скорости потока 50 мкл/минута, при этом диссоциацию реагента PDGF-B, связанного с захваченным моноклональным антителом к PDGF-B, отслеживали в течение 10 минут в подвижном буфере HBS-T. Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем аппроксимации кривых сенсограмм, записываемых в режиме реального времени, к модели связывания 1:1 с ограничением по движению масс с использованием программного обеспечения Scrubber 2.0с. Равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) и полупериод диссоциации ( $t^{1/2}$ ) для разных моноклональных антител к PDGF-B рассчитывали исходя из кинетических констант скорости как:

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

[0229] Параметры кинетики связывания для связывания hPDGF-B или mPDGF-B с разными моноклональными антителами к PDGF-B по данному изобретению при 25°C и 37°C показаны в **таблицах 2-4**.

**Таблица 2.** Аффинность и  $t_{1/2}$  17 mAb к PDGF-B - сравнение между антителами человека и мыши.

		Человека				Мыши			
		25 °С		37 °С		25 °С		37 °С	
		$K_D$	$t_{1/2}$	$K_D^*$	$t_{1/2}$	$K_D$	$t_{1/2}$	$K_D^*$	$t_{1/2}$
*-mAb сортировали исходя из их значений аффинности связывания с мономерным PDGF BB человека при 37 °С									
Ab PID	Линия	(моль/л)	(мин)	(моль/л)	(мин)	(моль/л)	(мин)	(моль/л)	(мин)
H4H13127P		1,93E-12	≥1155	1,31E-12	≥1155	NB	NB	NB	NB
H4H13145P		2,79E-12	≥1155	1,36E-12	≥1155	2,30E-12	≥1155	9,54E-13	≥1155
H4H13132P		2,26E-12	≥1155	1,84E-12	≥1155	1,93E-12	≥1155	8,67E-11	≥1155
H4H13167P		5,53E-12	≥1155	2,75E-12	≥1155	NB	NB	NB	NB
H4H13148P		7,14E-11	12,5	8,99E-11	17	3,60E-10	2,8	2,43E-10	3,0
H4H13169P		6,24E-10	1,6	1,33E-10	5	5,84E-10	2,2	2,22E-10	3,7
H4H13166P		1,59E-10	16,9	2,24E-10	8	NB	NB	NB	NB
H4H13143P		1,32E-09	0,7	2,46E-10	3	1,24E-09	0,8	8,61E-11	5,0
H4H13163P		5,84E-10	2,4	2,47E-10	4	7,61E-10	2,0	1,93E-10	4,2
H4H13159P		3,10E-10	3,6	2,62E-10	4	3,94E-10	2,8	3,52E-10	3,8
H4H13151P		1,04E-09	1,8	2,99E-10	3	1,22E-09	1,3	3,35E-10	2,4
H4H13157P		8,44E-10	1,0	3,15E-10	2	2,49E-09	6,6	6,68E-10	1,8
H4H13162P		1,21E-10	11,5	3,20E-10	6	3,42E-10	5,9	1,74E-10	6,3
H4H13155P		1,05E-09	1,3	4,42E-10	2	1,85E-09	0,7	4,04E-10	1,3
H4H13170P		1,74E-09	0,6	7,89E-10	0,9	7,25E-10	1,0	8,81E-10	0,8
H4H13152P		2,21E-09	0,5	1,02E-09	0,8	1,63E-09	0,8	5,08E-10	0,9
H4H13153P		NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
буфер		NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB

NB; в текущих условиях эксперимента связывания не наблюдали.

Таблица 3. Показатели кинетики связывания PDGF BB человека при 25°C и 37 °C.

*-mAb сортировали исходя из их значений аффинности связывания с мономерным PDGF BB человека при 37 °C		25 °C								37 °C					
		Захваченное $\alpha$ -PDGF BB mAb		PDGF BB человека - связанный при 50 нМ	$k_a$	$k_d$	$K_D$	$t_{1/2}$	Захваченное $\alpha$ -PDGF BB mAb		PDGF BB человека - связанный при 50 нМ	$k_a$	$k_d$	$K_D^*$	$t_{1/2}$
		Ab PID	Линия						(RU)	(SE)					
H4H13 127P		149	14	49	5,19E+06	$\geq 1,00$ E-05	1,93E-12	$\geq 11$ 55	208	14	62	7,65E+06	$\geq 1,00$ E-05	1,31E-12	$\geq 11$ 55
H4H13 145P		188	7	46	3,59E+06	$\geq 1,00$ E-05	2,79E-12	$\geq 11$ 55	226	15	58	7,35E+06	$\geq 1,00$ E-05	1,36E-12	$\geq 11$ 55
H4H13 132P		217	9	52	4,43E+06	$\geq 1,00$ E-05	2,26E-12	$\geq 11$ 55	291	5	70	5,45E+06	$\geq 1,00$ E-05	1,84E-12	$\geq 11$ 55
H4H13 167P		179	7	51	1,81E+06	$\geq 1,00$ E-05	5,53E-12	$\geq 11$ 55	235	17	70	3,63E+06	$\geq 1,00$ E-05	2,75E-12	$\geq 11$ 55
H4H13 148P		229	2	59	1,29E+07	9,22 E-04	7,14E-11	12, 5	336	3	83	7,70E+06	6,92 E-04	8,99E-11	17
H4H13 169P		130	1	29	1,13E+07	7,08 E-03	6,24E-10	1,6	190	3	39	1,62E+07	2,15 E-03	1,33E-10	5
H4H13 166P		229	3	61	4,30E+06	6,82 E-04	1,59E-10	16, 9	318	3	81	6,31E+06	1,42 E-03	2,24E-10	8
H4H13 143P		159	1	30	1,25E+07	1,65 E-02	1,32E-09	0,7	241	0,1	37	1,69E+07	4,15 E-03	2,46E-10	3
H4H13 163P		158	3	32	8,30E+06	4,85 E-03	5,84E-10	2,4	222	1	38	1,07E+07	2,65 E-03	2,47E-10	4

H4H13 159P	234	0,4	39	1,05E+ 07	3,25 E-03	3,10E -10	3,6	331	0,5	61	1,04E+ 07	2,71 E-03	2,62E -10	4
H4H13 151P	180	4	40	6,33E+ 06	6,56 E-03	1,04E -09	1,8	251	1	46	1,18E+ 07	3,52 E-03	2,99E -10	3
H4H13 157P	134	3	20	1,31E+ 07	1,11 E-02	8,44E -10	1,0	199	3	29	2,07E+ 07	6,54 E-03	3,15E -10	2
H4H13 162P	135	1	38	8,29E+ 06	1,00 E-03	1,21E -10	11, 5	199	1	50	5,83E+ 06	1,86 E-03	3,20E -10	6
H4H13 155P	269	1	50	8,61E+ 06	9,01 E-03	1,05E -09	1,3	346	0,8	56	1,07E+ 07	4,72 E-03	4,42E -10	2
H4H13 170P	197	1	31	1,19E+ 07	2,08 E-02	1,74E -09	0,6	275	0,3	38	1,68E+ 07	1,33 E-02	7,89E -10	0,9
H4H13 152P	149	4	18	1,13E+ 07	2,49 E-02	2,21E -09	0,5	215	5	25	1,44E+ 07	1,47 E-02	1,02E -09	0,8
H4H13 153P	199	1	5	NB	NB	NB	NB	286	0,5	7	NB	NB	NB	NB
буфер	3	0,2	4	NB	NB	NB	NB	10	0,3	6	NB	NB	NB	NB

NB; в текущих условиях эксперимента связывания не наблюдали.

Таблица 4. Показатели кинетики связывания PDGF BB мыши при 25°C и 37 °C.

* -mAb сортировали исходя из их значений аффинности связывания с мономерным PDGF BB человека при 37 °C	25 °C							37 °C						
	Захваченное $\alpha$ -PDGF-B mAb		PDGF BB мыши - связанный при 50 нМ	$k_a$	$k_d$	$K_D$	$t_{1/2}$	Захваченное $\alpha$ -PDGF-B mAb		PDGF BB мыши - связанный при 50 нМ	$k_a$	$k_d$	$K_D^*$	$t_{1/2}$
Ab ID	Ли	(RU)	(SE)	(л/моль)	(1/с)	(моль/л)	(мин)	(RU)	(SE)	(л/моль*)	(1/с)	(моль/л)	(мин)	
H4H13 127P		140	8	1	NB	NB	NB	201	8	4	NB	NB	NB	NB

H4H13 145P	167	2	37	4,34E+ 06	$\geq 1,00$ E-05	2,30E -12	$\geq 11$ 55	207	4	46	1,05E+ 07	$\geq 1,00$ E-05	9,54E -13	$\geq 11$ 55
H4H13 132P	206	1	43	5,18E+ 06	$\geq 1,00$ E-05	1,93E -12	$\geq 11$ 55	291	3	65	1,15E+ 05	$\geq 1,00$ E-05	8,67E -11	$\geq 11$ 55
H4H13 167P	182	6	1	NB	NB	NB	NB	221	4	1	NB	NB	NB	NB
H4H13 148P	252	5	39	1,14E+ 07	4,12 E-03	3,60E -10	2,8	341	1	57	1,57E+ 07	3,82 E-03	2,43E -10	3,0
H4H13 169P	132	1	26	9,12E+ 06	5,33 E-03	5,84E -10	2,2	192	2	36	1,41E+ 07	3,14 E-03	2,22E -10	3,7
H4H13 166P	238	9	2	NB	NB	NB	NB	320	1	4	NB	NB	NB	NB
H4H13 143P	156	1	30	1,22E+ 07	1,52 E-02	1,24E -09	0,8	242	1	38	2,68E+ 07	2,31 E-03	8,61E -11	5,0
H4H13 163P	155	1	28	7,54E+ 06	5,74 E-03	7,61E -10	2,0	225	2	35	1,43E+ 07	2,77 E-03	1,93E -10	4,2
H4H13 159P	235	0,5	38	1,06E+ 07	4,17 E-03	3,94E -10	2,8	331	1	56	8,62E+ 06	3,03 E-03	3,52E -10	3,8
H4H13 151P	178	4	36	7,26E+ 06	8,87 E-03	1,22E -09	1,3	250	1	41	1,41E+ 07	4,72 E-03	3,35E -10	2,4
H4H13 157P	142	4	19	7,03E+ 05	1,75 E-03	2,49E -09	6,6	208	2	28	9,55E+ 06	6,38 E-03	6,68E -10	1,8
H4H13 162P	142	6	36	5,72E+ 06	1,96 E-03	3,42E -10	5,9	201	1	46	1,05E+ 07	1,84 E-03	1,74E -10	6,3
H4H13 155P	269	0,2	38	9,20E+ 06	1,70 E-02	1,85E -09	0,7	348	1	44	2,13E+ 07	8,61 E-03	4,04E -10	1,3
H4H13 170P	197	1	31	1,65E+ 07	1,20 E-02	7,25E -10	1,0	275	0,3	33	1,65E+ 07	1,45 E-02	8,81E -10	0,8
H4H13 152P	158	2	15	9,17E+ 06	1,49 E-02	1,63E -09	0,8	229	4	23	2,46E+ 07	1,25 E-02	5,08E -10	0,9
H4H13 153P	201	1	2	NB	NB	NB	NB	290	1	4	NB	NB	NB	NB
буфер	3	0,2	4	NB	NB	NB	NB	10	0,1	1	NB	NB	NB	NB

NB: в текущих условиях эксперимента связывания не наблюдали.

Параметры кинетики связывания для связывания hPDGF-B или mPDGF-B с иллюстративными антителами к PDGF-B по данному изобретению при 37°C показаны в **таблицах 5-6**.

**Таблица 5.** Аффинность связывания и  $t_{1/2}$  при 37°C для H4H13132P в Via-core.

PDGF BB человека - связанный при 50 нМ, 37 °C		PDGF BB мыши - связанный при 50 нМ, 37 °C		PDGF-BB яванского макака - связанный при 30 нМ, 37 °C	
$K_D^*$	$t_{1/2}$	$K_D^*$	$t_{1/2}$	$K_D^*$	$t_{1/2}$
(моль/л)	(мин)	(моль/л)	(мин)	(моль/л)	(мин)
1,84E-12	≥1155	8,67E-11	≥1155	9,67E-12	277,2

**Таблица 6.** Аффинность связывания и  $t_{1/2}$  при 37°C для H4H13145P в Via-core.

PDGF BB человека - связанный при 50 нМ, 37 °C		PDGF BB мыши - связанный при 50 нМ, 37 °C		PDGF-BB яванского макака - связанный при 30 нМ, 37 °C	
$K_D^*$	$t_{1/2}$	$K_D^*$	$t_{1/2}$	$K_D^*$	$t_{1/2}$
(моль/л)	(мин)	(моль/л)	(мин)	(моль/л)	(мин)
1,36E-12	≥1155	9,54E-13	≥1155	1,61E-11	769,7

[0230] Эти данные по связыванию демонстрируют, что mAb к PDGF-B (например, H4H13132P и H4H13145P) могут специфически связываться с PDGF-BB человека, яванского макака, крысы и мыши при пМ концентрациях.

Пример 2. Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей.

[0231] В **таблице 7** представлены пары аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей выбранных антител, специфических в отношении PDGF-B, и их соответствующие идентификаторы антител. Антитела, как правило, названы в данном документе согласно следующей системе обозначений: префикс, соответствующий Fc (например, «H4H»), затем следует числовой идентификатор (например, «3132», как показано в **таблице 7**), затем следует суффикс «P». Таким образом, согласно этой системе обозначений антитело может называться, например, «H4H13132P». Префикс H4H в обозначениях антител, используемый в данном документе, означает конкретную Fc-область антитела. Например, «H4H»-антитело имеет Fc IgG4 человека.

**Таблица 7**

Обозначение антитела	SEQ ID NO:									
	HC VR	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LC VR	LCD R1	LCD R2	LCD R3	H C	L C
H4H13145P	2	4	6	8	10	12	14	16	1	2

(REGN13335)									8	0
H4H13132P	22	24	26	28	30	32	34	36	3	4
(REGN15171)									8	0

Пример 3. Перекрестная конкуренция между очищенными моноклональными антителами к PDGF-BB

[0232] С целью определения перекрестной конкуренции между очищенными моноклональными антителами к PDGF-BB (mAb), примерно 1,2-1,6 нМ mAb к PDGF-BB человека захватывают путем погружения биосенсоров Octet, покрытых  $\alpha$ -hFc, в лунки, содержащие 50 мкг/мл mAb к PDGF-BB человека, на 3 минуты (**фигура 3А**). H4H hFc (изотипический контроль) использовали в качестве отрицательных контролей. Незанятые сенсоры  $\alpha$ -hFc Octet насыщали путем погружения в лунки, содержащие блокирующий раствор mAb (200 мкг/мл Fc H4H человека (изотипический контроль) 1) на 4 минуты, и 100 нМ PDGF-BB человека (R&D) предварительно инкубировали с 1 мкМ mAb к PDGF-BB в течение по меньшей мере 2 часов. Насыщенные блокирующим mAb биосенсоры Octet погружали в лунки, содержащие предварительно полученную смесь mAb к PDGF-BB и PDGF-BB человека, на 4 минуты. В конце каждого цикла сенсоры  $\alpha$ -hFc Octet регенерировали в 10 мМ HCl. В ходе анализа, фоновый сигнал вследствие самосвязывания, обусловленный связыванием mAb с поверхностью захвата, вычитали из всей колонки. Ответ в виде связывания для mAb-1 сравнивали, и конкурирующие и неконкурирующие mAb объединяли в группы на основании их соответствующего ответа в виде связывания mAb-1.

[0233] Исследование по перекрестной конкуренции осуществляли на приборе Octet HTX при 25 °С с использованием подвижного буфера HBST+0,1 мг/мл BSA. Тип сенсора был анти-His, скорость потока для захвата/время составляло 1000 об/мин, в течение 3 минут, и скорость потока при введении образца/время составляло 1000 об/мин в течение различных периодов времени. На **фигуре 3В** представлена матрица, в которой показаны результаты по ответам в виде связывания из анализа перекрестной конкуренции антител. Аффинность очищенных антител варьируется в диапазоне от 0,002 нМ до 2 нМ.

Пример 4. Определение характеристик антител к PDGF-B с помощью ELISA

[0234] Антитела к PDGF-B были охарактеризованы в двух форматах ELISA с блокированием: блокирование связывания PDGF-BB и PDGF-AB с захваченным на планшете PDGFR-B. С целью проведения исследования, 1 мкг/мл PDGFR- $\beta$ -mmH человека (REGN 979, № партии 01-100326), покрывали планшеты в течение ночи при 4 °С.

[0235] Предварительное связывание: 12-точечное 3-кратное серийное разведение Ab из 100 нМ +100 пМ конечной конц. биот.-PDGF-AB (R&D, 222-AB) или 60 пМ конечной конц. биот.-PDGF-BB (R&D, 220-BB). 1 час при RT. Детектирование: 1:10000 SA-HRP.

[0236] Как показано на **фигурах 4А-С**, идентифицировали 5 сильных антител к PDGF-B, которые блокировали >70%; 3 антитела к PDGF-B блокировали как PDGF-BB, так и PDGF-AB с диапазоном значений IC<sub>50</sub> для PDGF-BB 0,23-1,8 нМ; 2 антитела к PDGF-B

блокировали только PDGF-BB с диапазоном значений  $IC_{50}$  0,55-0,64 нМ; 6 умеренно действующих антител к PDGF-B блокировали >45%; 2 антитела к PDGF-B блокировали как PDGF-BB, так и PDGF-AB с диапазоном значений  $IC_{50}$  для PDGF-BB 2,8-13 нМ; 4 антитела к PDGF-B блокировали только PDGF-BB с диапазоном значений  $IC_{50}$  0,64-2,8 нМ; и 6 антител к PDGF-B не были блокаторами.

Пример 5. Антитела к PDGF-B ингибируют PDGF-BB человека

[0237] С целью определения активности антител к PDGF-B осуществляли биологические анализы с использованием PDGF-BB. Для осуществления биологического анализа, подвергнутые клеточной сортировке клетки HEK293/SRE-Luc/hPDGFR $\beta$  в количестве 20000 клеток/лунка высевали в 0,1% FCS Optimum на ночь. Определяли зависимость доза-ответ для PDGF BB человека (Peprotech, № по каталогу 100-14B, № партии 111004, происходящий из *E. coli*) с использованием серийных разведений 1:3, начинающихся с 100 нМ. Ингибирование определяли для антител к PDGF-B, PDGFR $\beta$  (REGN2176, 08-R120731), и очищенные антитела (серийное разведение 1:3, начинающееся с 100 нМ), добавляли к клеткам с PDGF-BB человека при 500 пМ. Планшеты инкубировали в течение 5,5 часов при 37 °C и люминесценцию измеряли, используя One-Glo (Promega).

[0238] Как показано на **фигуре 5A**, 13 из 17 антител к hPDGF-B ингибировали 500 пМ hPDGF BB со значениями  $IC_{50}$  88 пМ - 7,2 нМ с максимальными показателями ингибирования 42-99%. Кроме того, как показано на **фигуре 5B**, два антитела к PDGF-B активировались PDGF-BB человека. На **фигуре 5C** показаны 8 из 17 антител к hPDGF-B, которые ингибировали 5 нМ PDGF-AB человека со значениями  $IC_{50}$  99 пМ - >50 нМ, с максимальными показателями ингибирования 32-99%. H4H13132P и H4H13145P блокировали до исходного уровня со значениями  $IC_{50}$  8,8 и 2,6 нМ. Наконец, на **фигуре 5D** показаны 10 из 17 антител к hPDGF-B, которые ингибировали 600 пМ PDGF-BB мыши со значениями  $IC_{50}$  450 пМ - 6,4 нМ, с максимальными показателями ингибирования 39-98%. Эти результаты демонстрируют, что 6 антител к PDGF-B проявляют полное ингибирование PDGF-BB человека со значениями  $IC_{50}$  310 пМ - 2 нМ. В частности, H4H13145P ингибирует все 3 лиганда, hPDGF BB, hPDGF AB и mPDGF BB, до исходного уровня. Данные по ингибированию активации PDGF-B путем применения иллюстративных антител к hPDGF-B в клетках HEK293/SRE-luc/hPDGFR $\beta$  обобщены в **таблицах 8-9** ниже.

**Таблица 8.** Ингибирование активации PDGF-B с помощью H4H13132P в клетках HEK293/SRE-luc/hPDGFR $\beta$ .

PDGF-BB человека		PDGF-AB человека		PDGF-BB мыши		PDGF-BB обезьяны	
EC50-2,1E-09		EC50-8,6E-09		EC50-9,3E-10		EC50-6,4E-11	
500 пМ hPDGF BB		5 нМ hPDGFAB		600 пМ mPDGFBB		500 пМ mfPDGFBB	
	(%)		(%)		(%)		(%)
	Ингибировани		Ингибировани		Ингибировани		Ингибировани
IC50	я	IC50	я	IC50	я	IC51	я

1,9E-9	94	8,8E-09	95	1,5E-9	87	8,9E-9	98,5
--------	----	---------	----	--------	----	--------	------

[0239] Н4Н13132Р проявляет более чем 87% ингибирование со значениями  $IC_{50}$  1,9-9,0 нМ в отношении hPDGF-BB, hPDGF-AB, mPDGF-BB и супоPDGF-BB.

**Таблица 9.** Ингибирование активации PDGF-B с помощью Н4Н13145Р в клетках HEK293/SRE-luc/hPDGFR $\beta$ .

PDGF-BB человека		PDGF-AB человека		PDGF-BB мыши		PDGF-BB обезьяны	
EC50-2,1E-09		EC50-8,6E-09		EC50-9,3E-10		EC50-6,4E-11	
500 пМ hPDGF BB		5 нМ hPDGFAB		600 пМ mPDGFBB		500 пМ mfPDGFBB	
	(%)		(%)		(%)		(%)
IC50	Ингибирования	IC50	Ингибирования	IC50	Ингибирования	IC51	Ингибирования
4,6E-10	99	2,6E-09	99	4,5E-10	98	3,2E-10	99

[0240] Н4Н13145Р проявляет полное ингибирование со значениями  $IC_{50}$  0,5-3 нМ в отношении hPDGF-BB, hPDGF-AB, mPDGF-BB и супоPDGF-BB.

Пример 6. Анализ комплексов, образующихся между рекомбинантным PDGF-BB человека и моноклональными антителами (mAb) к PDGF-B

[0241] Эксклюзионную хроматографию в сочетании с многоугловым рассеянием лазерного излучения (SEC-MALLS) использовали для оценки распределения относительных размеров комплексов, образующихся между рекомбинантным PDGF-BB человека (Perrotech) и несколькими ведущими mAb к PDGF. Пять мМ PDGF-BB+ 5 мМ mAb (эквимолярные соотношения) готовили в 1X PBS, уровень pH 7,4, для каждого тестируемого mAb к PDGF-B и оставляли инкубироваться при комнатной температуре в течение 3 часов до фракционирования общего белка с помощью SEC-MALLS. В условиях SEC-MALLS, 100 мг (общий белок) каждого образца вводили в двух повторах в колонку GE Healthcare Superose 6 10/300 GL в 1X PBS, уровень pH 7,4, (подвижная фаза) с временем записи хроматограммы 90 минут на введение.

[0242] Н4Н13145Р (пик 1) по большей части образовывало отдельный комплекс (пик 2) с PDGF-BB человека, что согласуется с наличием соединений mAb:PDGF-BB человека 2:2 (**фигура 6А**). Кроме того, Н4Н13145Р (пик 1) по большей части образовывало отдельный комплекс (пик 2) с PDGF-BB человека, что согласуется с наличием соединений mAb:PDGF-BB человека 2:2 (**фигура 6В**). На **фигуре 6С** показаны наложенные хроматограммы из образцов, образующих наиболее отчетливые соединения mAb:PDGF-BB человека 2:2 без выявляемых комплексов более высокого порядка.

[0243] В целом, большинство mAb к PDGF, по-видимому, образовывали по большей части отчетливый комплекс с PDGF-BB человека, что согласуется с наличием соединения mAb:hPDGF-BB 2:2, при этом наблюдали комплексы более высокого порядка («бумажная кукла») в незначительном количестве или с полным их отсутствием. Небольшое количество

комплексов более высокого порядка, больше чем соединения mAb:hPDGF-BB 2:2, наблюдали в образцах H4H13132P, H4H13145P и H4H13162P; однако, неясно, образовались ли эти комплексы в результате взаимодействия hPDGF-BB с мономерной формой антитела или с мультимерами антител (HMW-соединения), которые присутствовали в различных количествах в каждом образце mAb. В альтернативном варианте, комплексы более высокого порядка в этих образцах могли быть обусловлены взаимодействием мономерного антитела с небольшим количеством мультимерного hPDGF-BB, который также выявлялся. Образцы H4H13148P и H4H13169P, по-видимому, образовывали наиболее отчетливое соединение mAb:hPDGF-BB 2:2, без выявляемых комплексов более высокого порядка. Интересно, что, хотя комплексы, образующиеся для этих двух образцов имели подобные расчетные молярные массы, комплексы, образующиеся H4H13148P, элюировались значительно позже, чем эквивалентные комплексы H4H13169P, что свидетельствует о том, что молекулярная форма (гидродинамический радиус) комплексов, образующихся H4H13148P, в природе является более компактной. В образце H4H13155P наблюдалось широкое распределение комплексов < предполагаемой молярной массы комплекса mAb:hPDGF-BB 2:2, что может указывать на то, что комплексы, образующиеся с hPDGF-BB в растворе, диссоциировали в ходе процесса фракционирования, или что образец не достиг равновесия в тестируемых условиях эксперимента.

Пример 7. Валидация белкового биологического анализа с использованием PDGF-BB яванского макака для моноклональных антител к PDGF-B - H4H13132P и H4H13145P

[0244] PDGF-BB яванского макака были получены от KingFisher и Sino Biological в виде Fc-слитого продукта. Клетки HEK293/SRE-Luc/mfPDGFB-ecto/hPDGFRb-cyto p2 высевали в 96-луночные планшеты, и добавляли клетки при 80 мкл/лунка в количестве  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл (20000 клеток/лунка) на ночь при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Зависимость доза-ответ для PDGF-BB определяли при 1-3 разведениях, начиная с 20 нМ. Для определения ингибирования, анализировали серийно разведенные 1:3 Ab, начиная с 500 нМ с 500 пМ PDGF-BB в качестве константы. Планшеты инкубировали при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 5,5 часов. Планшеты убирали из инкубатора и уравнивали при комнатной температуре (RT) в течение примерно 30 минут. Во все лунки планшетов добавляли 100 мкл субстрата One-glo (уравновешенного до RT) и содержимое перемешивали на шейкере для планшетов при RT в течение 10 минут. Люминесценцию измеряли с использованием SpectraMaxi3X (PerkinElmer™). Как показано на **фигуре 7**, в этой системе анализа было идентифицировано, что H4H13145P является более сильным, чем H4H13132P в отношении белков PDGF-BB как человека, так и яванского макака.

[0245] Следующие анализы использовали для определения способности антител к PDGF-B блокировать передачу сигналов, индуцированную PDGF-BB яванского макака, в клетках с экспрессией внеклеточного домена PDGFRβ обезьяны.

#### *Люциферазный биологический анализ*

[0246] Сконструированную линию клеток HEK293/SRE-Luc/mfPDGFRβ-ecto/hPDGFRb-cyto (ACL7804) использовали для анализа способности H4H13145P и

H4H13132P нейтрализовать экспрессию люциферазы, обусловленную PDGF-BB яванского макака. Клетки высевали в 96-луночные планшеты с использованием среды для анализа (0,5% бычий сывороточный альбумин, 1% пенициллин-стрептомицин-глутамин в среде DMEM) и подвергали сывороточному голоданию в течение ночи (37 °C, 5,0% CO<sub>2</sub>).

*Получение кривых зависимости доза-ответ*

[0247] Кривую зависимости доза-ответ для PDGF-BB яванского макака определяли путем добавления лиганда, разведенного в среде для анализа, к клеткам HEK293/SRE-Luc/mfPDGFR $\beta$ -ecto/hPDGFRb-cyto при концентрациях в диапазоне от 3 пМ до 20 нМ. Каждую концентрацию тестировали в двух повторах, и лунки без добавления лиганда служили в качестве отрицательных контролей. После добавления PDGF-BB яванского макака клетки инкубировали в течение 5,5 часов при 37 °C, 5,0% CO<sub>2</sub>, а затем уравнивали до комнатной температуры в течение 30 минут. Равный объем субстрата люциферазы ONE-Glo добавляли к каждой лунке и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение еще 5 минут. Относительные световые единицы (RLU) измеряли на планшет-ридере SpectraMaxi3X, и значения анализировали с помощью четырехпараметрической логистической модели по кривой зависимости доза-ответ из 10 точек (GraphPad Prism).

*Получение кривых ингибирования*

[0248] H4H13145P и H4H13132P тестировали в отношении ингибирования передачи сигналов с участием mfPDGFR $\beta$ , опосредованной PDGF-BB яванского макака, в линии клеток HEK293/SRE-Luc/mfPDGFR $\beta$ -ecto/hPDGFRb-cyto. H4H13145P, H4H13132P или антитело в качестве отрицательного контроля (REGN1945) добавляли в двух повторах к клеткам в концентрациях в диапазоне от 228 пМ до 500 нМ с последующим добавлением PDGF-BB яванского макака при 500 пМ. Планшеты инкубировали при 37 °C, 5,0% CO<sub>2</sub> в течение 5,5 часов и уравнивали до комнатной температуры в течение 30 минут. Равный объем субстрата люциферазы ONE-Glo добавляли к каждой лунке и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение еще 5 минут. Относительные световые единицы (RLU) измеряли на планшет-ридере SpectraMaxi3X, и значения анализировали с помощью четырехпараметрической логистической модели по кривой зависимости доза-ответ из 10 точек (GraphPad Prism).

*Результаты*

*Блокирование передачи сигналов с участием mfPDGFR $\beta$ , опосредованной лигандом PDGF-BB яванского макака*

[0249] Концентрация Sino Biologics PDGF-BB яванского макака с Fc-меткой, требуемая для стимуляции передачи сигналов с участием mfPDGFR $\beta$  до 50% максимального уровня активности (EC<sub>50</sub>) в линии клеток HEK293/SRE-Luc/mfPDGFR $\beta$ -ecto/hPDGFRb-cyto, составляла 167 пМ (**фигура 7**). Концентрацию антитела, требуемую для подавления опосредованной PDGF-BB передачи сигналов до 50% максимальной активности (IC<sub>50</sub>) в присутствии фиксированной концентрации PDGF-BB яванского макака, определяли для H4H13132P, H4h13145P и антитела изотипического контроля, REGN1945

(антитело, вырабатываемое к Fel d 1 кошек, без связывания с mfPDGFR $\beta$ ). Как показано на **фигуре 7**, H4H13132P и H4H13145P эффективно блокировали опосредованную PDGF-BB яванского макака передачу сигналов, индуцированную фиксированной концентрацией PDGF-BB яванского макака 500 пМ, со значением IC<sub>50</sub> 781 пМ и 16 пМ соответственно. Напротив, IgG4-антитело изотипического контроля, REGN1945, было неэффективным в блокировании опосредованной PDGF-BB яванского макака передачи сигналов, индуцированной PDGF-BB яванского макака.

Пример 8. Валидация Biacore для оценки связывания коммерческих реагентов PDGF-BB обезьяны с моноклональными антителами к PDGF-B - H4H13132P и H4H13145P

[0250] С целью определения показателей кинетики связывания коммерческих PDGF-BB обезьяны (Kingfisher, Sino Biological) с mAb к PDGF-B H4H13132P и H4H13145P, примерно 250-350 RU mAb к PDGF-B захватывали с помощью отрицательного контроля (REGN1945) на покрытом антителом к hFc HCA-чипе для MASS-2 при 25 °C. Готовили 90 нМ PDGF-BB человека и обезьяны и подвергали 3-кратному серийному разведению. Образец вводили при 25 мкл/минута в течение 3 минут и отслеживали диссоциацию в течение 10 минут. Параметры кинетики оценивали путем аппроксимации данных, записываемых в режиме реального времени, к модели связывания 1:1 с ограничением по движению масс. Как показано на **фигуре 8**, коммерческий PDGF-BB обезьяны показал специфическое связывание с mAb к PDGF-B H4H13132P и H4H13145P.

Пример 9. Выявление с помощью вестерн-блота связываемых mAb эпитопов на PDGF-BB

[0251] Ключом к пониманию различной эффективности антител является определение сайтов связывания или эпитопов, которые они распознают. Эпитопы обычно делятся на две категории, линейные эпитопы, в которых отрезок из непрерывных аминокислот является достаточным для связывания, и конформационные эпитопы, в которых ключевые аминокислотные остатки объединяются в результате укладки белка. Линейные эпитопы могут быть предпочтительными для применений, в которых белок-мишень полностью или частично денатурируется в ходе подготовки образца перед иммуноанализом, например, в вестерн-блоте (WB). Соответственно, вестерн-блот-анализ PDGF-BB с H4H13145P и H4H13132P осуществляли для определения того, связываются ли эти mAb с линейными эпитопами.

[0252] Рекомбинантный димерный белок PDGF-BB человека (CF) от R&D System в количестве 1 мкг разделяли в градиентном 5-20% SDS PAGE-геле в восстанавливающих (R) и невосстанавливающих (NR) условиях. Следующие этапы использовали для выявления полосок PDGF-BB как в R, так и в NR условиях с mAb к PDGF-BB H4H13145P и коммерческим аб к PDGF-BB (R&D аб к PDGF-BB человека: антитело AF-220-NA к PDGF-BB человека). Для блокирования сайтов неспецифического связывания: PVDF-мембраны блокировали в 5% BSA в течение 1 часа при комнатной температуре. Для первичного Аб-блоттинга: PVDF-мембрану инкубировали с (1) mAb к PDGF-BB H4H13145P или (2) R&D mAb к PDGF-BB при разведении 1,0 мкг/мл в 5% BSA TBST в течение ночи при 4 °C.

Мембрану промывали в промывочном буфере TBST в течение 10 минут (три раза) при комнатной температуре. Инкубацию со вторичным антителом включало инкубирование мембраны в растворе HRP-конъюгированного вторичного Ab к антителу мыши в 5% BSA TBST в течение 1 часа при комнатной температуре. Промывка мембраны включала применение буфера TBST в течение 10 минут (три раза) при комнатной температуре. Сигнал выявляли с помощью усилителя сигнала для вестерн-блота Pierce™.

Один мкг/дорожку рекомбинантного PDGF-BB человека разделяли с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих (R) и невосстанавливающих (NR) условиях и визуализировали с помощью окрашивания серебряным красителем, в результате чего наблюдали полосы 13 кДа и 28 кДа соответственно. На **фигуре 9** показано, что вестерн-блот-анализ связываемых антителом эпитопов подтвердил, что H4H13145P связывается с линейными эпитопами rPDGF-BB человека.

Пример 10. Доклиническая экспериментальная оценка эффективности H4H13145P в отношении РАН

[0253] Блокирование PDGF-B посредством ведущего mAb (H4H13145P) обеспечивало надежную терапевтическую пользу в нескольких моделях РАН (мышь+крыса). Такие эффекты были более впечатляющими, чем любые методы лечения или контрольные показатели на сегодняшний день, включая SOC. Такие результаты демонстрируют, что антитело к PDGF-B будет обеспечивать эффективную терапию РАН без сосудорасширяющих механизмов.

[0254] Для оценки эффекта антитела к PDGF-B, H4H13145P, при легочной артериальной гипертензии осуществляли отдельные исследования с использованием модели индуцированной хронической гипоксией легочной артериальной гипертензии у мышей и крысиной модели с использованием монокроталина.

[0255] Модели РАН обобщены в **таблице 10** ниже.

**Таблица 10.** Доклинические модели РАН.

Модель	Вид	Индукция	Механизм действия	Релевантность в отношении человека	Ограничения
Гипоксия/ Sugen5416	Мышь	4-8 недель непрерывного воздействия 10% O <sub>2</sub> с еженедельным введением Sugен с помощью s.c. инъекции	Гипоксия Ингибирование VEGFR2 Отбор устойчивых к апоптозу эндотелиальных клеток	Релевантно гипоксии у людей Умеренное изменение легочного кровяного давления Наблюдаемый фенотип «обрезки» сосудов	Компенсаторная гипертрофия правых отделов сердца Отсутствие плексиформных поражений Отсутствие утолщения средней оболочки сосудов

Модель	Вид	Индукция	Механизм действия	Релевантность в отношении человека	Ограничения
<b>МСТ</b>	Крыса	4-6 недель, (однократная subQ инъекция МСТ (40-60 мг/кг)	Метаболит повреждает эндотелий, Механизм неясен	↑ Давления в правых отделах сердца Гипертрофия правых отделов сердца (индекс Фултона) Прогрессирующая РАН и сердечная недостаточность Гиперплазия интимы, гипертрофия средней оболочки и адвентициальное утолщение	МСТ-синдром, состоящий из интерстициального отека легких, миокардита и веноокклюзионной болезни печени, что нехарактерно для тяжелой РАН человека; Смерть в результате сердечной или почечной дисфункции;
<b>Гипоксия/ Sugen5416*</b>	Крыса	3 недели непрерывного воздействия 10% O <sub>2</sub> с еженедельным введением путем инъекции Sugен → 3 недели условий с нормальным содержанием кислорода	То же, что и в случае мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/Sugen	Прогрессирующая недостаточность правых отделов сердца Предсказуемо тяжелая РАН, вызванная ангиооблитерирующими поражениями Гиперплазия интимы, гипертрофия средней оболочки и адвентициальное утолщение	Sugen ингибирует другие RTK: PDGFRb, c-KIT, MET, FLT3 и RET

[0256] Для этих исследований использовали нижеследующие материалы и способы.

### **Материалы и способы**

#### ***Мыши***

[0257] Легочная артериальная гипертензия (РАН) характеризуется ремоделированием легочных сосудов, которое приводит к прогрессирующему повышению сосудистого сопротивления. Повышенное легочное давление индуцирует компенсаторную гипертрофию правого желудочка и, в конечном итоге, недостаточность. Тромбоцитарный фактор роста В (PDGF-B) является сильным митогеном, который является членом

семейства тромбоцитарных факторов роста (PDGF). Было показано, что передача сигналов с участием PDGF-B/PDGFR $\beta$  является центральным сигнальным путем, осуществляющим регуляцию патологического ремоделирования легочных артерий. Это исследование предназначено для сравнения эффективности антител к PDGF-B и PDGFR $\beta$  у мышей с РАН, индуцированной гипоксией/Sugen, при терапевтических дозах.

[0258] Для первого исследования использовали 14-16-недельных самцов мышей PDGFR $\beta$ <sup>hu-hu</sup> (MAID№ 1639) с гуманизированными последовательностями. Мышей разделяли на группы обработки по массе таким образом, чтобы исходная масса тела была одинаковой в разных группах. Клетки были выбраны так, чтобы они либо оставались при ~21% O<sub>2</sub> (нормобарическая нормоксия), либо их помещали в камеру (модифицированный 6' полужесткий изолятор, Charles River) с 10% O<sub>2</sub> (нормобарическая гипоксия), в которой поддерживались низкие уровни O<sub>2</sub> с регулировкой потока N<sub>2</sub> к постоянному притоку комнатного воздуха. Мышам в камере с низким содержанием кислорода подкожно вводили ингибитор VEGF-рецептора Sugен5146 при 20 мг/кг один раз в неделю в течение 6 недель. Начиная с 21-х суток, мышам вводили антитела в течение 3 недель, как описано в таблице 11. К концу 6-й недели измеряли систолическое давление в правом желудочке (RVSP) с помощью катетеризации правых отделов сердца, и RV-гипертрофию рассчитывали по индексу Фултона как соотношение масс RV и (LV+сердечная перегородка).

Для второго исследования (исследование 2) использовали 12-14-недельных самцов мышей C57/BL (Taconic). Мышей разделяли на группы обработки по массе таким образом, чтобы исходная масса тела была одинаковой в разных группах. Клетки были выбраны так, чтобы они либо оставались при ~21% O<sub>2</sub> (нормобарическая нормоксия), либо их помещали в камеру (модифицированный 6' полужесткий изолятор, Charles River) с 10% O<sub>2</sub> (нормобарическая гипоксия), в которой поддерживались низкие уровни O<sub>2</sub> с регулировкой потока N<sub>2</sub> к постоянному притоку комнатного воздуха. Мышам в камере с низким содержанием кислорода подкожно вводили ингибитор VEGF-рецептора Sugен5146 при 20 мг/кг один раз в неделю в течение 6 недель. Начиная с 21-х суток, мышам вводили антитела в течение 3 недель, как описано в таблице 12. К концу 6-й недели измеряли систолическое давление в правом желудочке (RVSP) с помощью катетеризации правых отделов сердца, и RV-гипертрофию рассчитывали по индексу Фултона как соотношение масс RV и (LV+сердечная перегородка). Сыворотку крови у мышей собирали на 42-е сутки для оценки IgG-антитела человека.

*Катетеризация правых отделов сердца и систолическое давление в правом желудочке*

[0259] Мышей анестезировали изофлураном и удерживали при примерно 37°C с использованием нагреваемой платформы (Heated Hard Pad 1, Braintree Scientific) и циркуляционного водяного насоса с подогревом (T/Pump Classic, Gaymar Industries). Область шеи каждой мыши готовили к хирургическому вмешательству путем депиляции над правой общей сонной артерией и правой яремной веной. Делали разрез и осторожно изолировали правую яремную вену, чтобы не повредить сонную артерию и/или

блуждающий нерв. Кусок шелковой хирургической нити 5-0 помещали под изолированную яремную вену, чтобы обеспечить возможность ретракции сосуда краниально, затем с помощью иглы 30 калибра делали отверстие в яремной вене. Катетер для измерения давления (датчик давления для катетера Micro-tip SPR-1000, Millar Instruments, Inc.) вставляли в отверстие яремной вены и продвигали через правое предсердие в правый желудочек. Катетер присоединяли к прибору для измерения давления/объема (MPVS-300, Millar Instruments, Inc.), который позволяет измерять частоту сердечных сокращений, а также как диастолическое, так и систолическое давление в правом желудочке. Эти параметры были получены в цифровом виде с использованием системы сбора данных (PowerLab 4/35, AD Instruments). Программное обеспечение LabChart Pro 7.0 (AD Instruments) использовали для анализа показателей давления в правом желудочке. Показания были количественно оценены для 60-секундного интервала отслеживания давления (после 2-минутного периода записи, чтобы обеспечить стабилизацию давления). Анализируемые параметры включали показатели систолического давления в правом желудочке (RVSP), частоту сердечных сокращений (HR) и скорость повышения давления в правом желудочке (dP/dt макс.).

#### *Оценка гипертрофии правых отделов сердца*

[0260] После гемодинамических измерений *in vivo*, животных умерщвляли с помощью процедур обескровливания под наркозом, а затем собирали и взвешивали ткань свободной стенки RV, левого желудочка (LV) и сердечной перегородки. Гипертрофию RV рассчитывали по индексу Фултона как соотношение масс RV и (LV+сердечная перегородка). Затем ткань RV сохраняли замороженной (-80 °C) для биохимических анализов. Гематокрит получали для каждой мыши сразу же после умерщвления.

#### *Оценка IgG сыворотки крови человека*

[0261] IgG-антитело человека к PDGF-B сыворотки крови захватывают на Gyrolab Bioaffy™ 200 CD с помощью биотинилированного моноклонального антитела мыши к IgG1/IgG4 человека (REGN2567), разведенного в глицерине, и выявляют с помощью конъюгированного с Alexa Fluor 647 антитела мыши к каппа-цепи человека, разведенного в глицерине. Образцы сыворотки крови обрабатывают, как описано ниже: 1) разведение образцов сыворотки крови 1:50 в буфере для разведения; разведение стандартов до начальной концентрации 2 мкг/мл с использованием буфера для разведения с целью получения в общей сложности 8 точек стандартов. 2) Разведение биотинилированного антитела мыши к IgG1/IgG4 человека до 100 мкг/мл в промывочном буфере. 3) Разведение конъюгированного с Alexa Fluor 647 антитела мыши к каппа-цепи человека до 10 мкг/мл в промывочном буфере. 4) Центрифугирование антитела для захвата и выявления при 15000 RCF в течение 5 минут. 5) Дополнительное разведение антитела для выявления (следует применять только верхний слой отцентрифугированного антитела для выявления) до конечной концентрации 0,5 мкг/мл в буфере для выявления. 6) Используя сгенерированную GYROS карту планшета, загрузка образцов, стандартов, промывочных буферов и антител для захвата и выявления в 96-луночный планшет для ПЦР.

*Статистические анализы*

[0262] Количественные данные выражены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Данные статистических анализов, проводимых между двумя группами, анализировали с помощью t-критерия. Сравнение данных зависимости от времени анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Сравнение эффекта обработки в нескольких группах обработки, получающих лекарственное средство, анализировали с помощью однофакторного ANOVA. Для всех статистических анализов использовали программное обеспечение Prism. P-значение  $< 0,05$  соответствовало статистической значимости.

[0263] Схемы введения дозы для исследования 1 представлены в **таблице 11**.

**Таблица 11. Терапевтическое дозирование и протокол обработки для каждой группы в исследованиях на мышинных моделях с хронической гипоксией.**

Группа	Условия	Обработка	REGN#	Дозировка	Частота	Путь	День начала	Число мышей/группа
1	Нормобарическая нормоксия	Солевой раствор	N/A	5 мл/кг	2х/неделя	SC	21	15
2	Нормобарическая гипоксия 10%/Sugen541 6, 6 недель	Антитело изотипического контроля	REGN1 945	25 мг/кг	2х/неделя	SC	21	15
3	Нормобарическая гипоксия 10%/Sugen541 6, 6 недель	Антитело к PDGF-B	H4H131 45P	25 мг/кг	2х/неделя	SC	21	15
4	Нормобарическая гипоксия 10%/Sugen541 6, 6 недель	Антитело к PDGFR $\beta$	REGN2 176	25 мг/кг	2х/неделя	SC	21	15

[0264] Схемы введения дозы для исследования 2 представлены в **таблице 12**.

**Таблица 12. Терапевтическое дозирование и протокол обработки для каждой группы в исследованиях на мышинных моделях с хронической гипоксией.**

Группа	Условия	Обработка	REGN#	Дозировка	Частота	Путь	День начала	Число мышей/группа
1	Нормобарическая нормоксия	Солевой раствор	N/A	5 мл/кг	2х/неделя	SC	21	10
2	Нормобарическая гипоксия 10%/Sugen5416, 6 недель	Антитело изотипического контроля	REGN1945	25 мг/кг	2х/неделя	SC	21	12
3	Нормобарическая гипоксия 10%/Sugen5416, 6 недель	Антитело к PDGF-B	H4H13145P	1 мг/кг	2х/неделя	SC	21	12
4	Нормобарическая гипоксия 10%/Sugen5416, 6 недель	Антитело к PDGF-B	H4H13145P	3 мг/кг	2х/неделя	SC	21	12
5	Нормобарическая гипоксия 10%/Sugen5416, 6 недель	Антитело к PDGF-B	H4H13145P	10 мг/кг	2х/неделя	SC	21	12
6	Нормобарическая гипоксия 10%/Sugen5416, 6 недель	Антитело к PDGF-B	H4H13145P	25 мг/кг	2х/неделя	SC	21	12

*Ультразвуковая оценка и анализ*

[0265] В последний день каждого исследования у каждой мыши оценивали размер легочной артерии и функцию и параметры правого желудочка, используя ультразвуковую высокочастотную систему (Vevo 2100, VisualSonics). Для оценки мышей анестезировали (1,5% изофлураном при скорости 1,0 куб. см./мл чистого кислорода) и отслеживали их температуру с помощью зонда для измерения ректальной температуры, и при этом ее удерживали на уровне примерно 37°C с помощью нагреваемой платформы (MouseMonitorS, Indus Instruments) и нагревающей лампы. Использовали визуализацию как в режиме яркости (В-режим), так и в режиме движения (М-режим). Для определения площади

поперечного сечения легочной артерии (PA CSA) на уровне легочного клапана использовали В-режим визуализации сердца мыши в поперечном сечении. Визуализацию в М-режиме использовали для определения интеграла линейной скорости кровотока (VTI), который получают из площади под кривой репрезентативных доплеровских спектров для кровотока через легочную артерию. Ударный объем правого желудочка (RV SV) рассчитывали как произведение PA CSA и VTI. Сердечный выброс для правого желудочка (RV CO) рассчитывали как произведение SV и частоты сердечных сокращений (HR). М-режим визуализации использовали для определения толщины свободной стенки правого желудочка (RVFW) во время диастолы и систолы. Перед оценкой давления в правом желудочке животных возвращали в их родные клетки.

#### *Оценка давления в правом желудочке*

[0266] Далее оценивали давление в правом желудочке для всех групп обработки. Мышей анестезировали изофлураном и удерживали при примерно 37°C с использованием нагреваемой платформы (Heated Hard Pad 1, Braintree Scientific) и циркуляционного водяного насоса с подогревом (T/Pump Classic, Gaymar Industries). Область шеи каждой мыши готовили к хирургическому вмешательству путем депиляции над правой общей сонной артерией и правой яремной веной. Делали разрез и осторожно изолировали правую яремную вену, чтобы не повредить сонную артерию и/или блуждающий нерв. Кусок шелковой хирургической нити 5-0 помещали под изолированную яремную вену, чтобы обеспечить возможность ретракции сосуда краниально, затем с помощью иглы 30 калибра делали отверстие в яремной вене. Катетер для измерения давления (датчик давления для катетера Micro-tip SPR-1000, Millar Instruments, Inc.) вставляли в отверстие яремной вены и продвигали через правое предсердие в правый желудочек. Катетер присоединяли к прибору для измерения давления/объема (MPVS-300, Millar Instruments, Inc.), который позволяет измерять частоту сердечных сокращений, а также как диастолическое, так и систолическое давление в правом желудочке. Эти параметры были получены в цифровом виде с использованием системы сбора данных (PowerLab 4/35, ADInstruments). Программное обеспечение LabChart Pro 7.0 (ADInstruments) использовали для анализа показателей давления в правом желудочке. Показания были количественно оценены для 60-секундного интервала отслеживания давления (после 2-минутного периода записи, чтобы обеспечить стабилизацию давления). Анализируемые параметры включали показатели систолического давления в правом желудочке (RVSP), частоту сердечных сокращений (HR) и скорость повышения давления в правом желудочке (dP/dt макс.). *Сбор сыворотки крови/ткани и оценка гипертрофии правого желудочка*

[0267] После завершения измерения давления в правом желудочке катетер убирали и каждое животное умерщвляли. Брюшную полость вскрывали и брали кровь из поллой вены для оценки гематокрита и сбора сыворотки крови. Затем вскрывали грудную полость и перевязывали среднюю долю правого легкого шелковой хирургической нитью 5-0, иссекали, помещали в RNAlater (Sigma-Aldrich, номер по каталогу R0901) и позже замораживали на 24 часа при -80 °C. У каждого животного иссекали сердце, и правый

желудочек (RV) аккуратно отрезали от левого желудочка и сердечной перегородки (LV+S). Оба кусочка сердечной ткани отдельно взвешивали на микровесах (AJ000, Mettler) для расчета индекса гипертрофии RV [RV/(LV+S); Индекс Фултона].

[0268] У половины животных из каждой группы обработки легкие перфузировали при 20-25 мм рт. ст. забуференным фосфатом солевым раствором (PBS, уровень pH 7,4), затем фиксировали 10% нейтральным забуференным формалином (NBF). Легкие оставляли в 10% NBF на 24 часа перед помещением в 70% этанол на по меньшей мере 48 часов перед обработкой ткани и заливкой в парафин. В случае животных, легкие которых не подвергали перфузии-фиксации, перед иссечением, взвешиванием и замораживанием в жидком N<sub>2</sub>, правую нижнюю долю лигировали шелковой хирургической нитью 5-0.

### **Крысы**

[0269] Использовали шести-семи-недельных самцов крыс Спрег-Доули. Крыс разделяли на группы обработки таким образом, чтобы исходная масса тела была одинаковой в разных группах. В исследовании 1, за сутки до инъекции монокроталина, крысам в группах обработки антителом подкожно вводили либо антитело к PDGF-B, либо IgG в качестве изотипического контроля при 25 мг/кг 2 раза в неделю в течение 28 суток. Группе стандартного лечения перорально вводили мацитентан при 30 мг/кг в сутки в течение 28 суток. На первые сутки крысам подкожно вводили либо 40 мг/кг монокроталина, либо 5 мл/кг солевого раствора. К концу 28-х суток измеряли систолическое давление в правом желудочке (RVSP) с помощью катетеризации правых отделов сердца, и RV-гипертрофию рассчитывали по индексу Фултона как соотношение масс RV и (LV+сердечная перегородка). В исследовании 2, крысам подкожно вводили либо 60 мг/кг монокроталина, либо 5 мл/кг солевого раствора. Начиная с 14-х суток, крысам в группах обработки антителом подкожно вводили либо антитело к PDGF-B, либо IgG в качестве изотипического контроля при 25 мг/кг 2 раза в неделю в течение 21 суток. Изменение массы тела с 0-х по 35-е сутки использовали для оценки общей токсичности и к 35-м суткам рассчитывали смертность животных.

[0270] Схемы введения дозы для исследования 1 представлены в **таблице 13**.

**Таблица 13.** Крысы с РАН, которым 4 недели вводили монокроталин, с использованием превентивной обработки лекарственным средством.

Группа	Условия	Обработка	REGN#	Дозировка	Частота	Путь	День начала	Число крыс/группа
1	Солевой раствор	Солевой раствор	N/A	5 мл/кг	Один раз на 1-е сутки	SC	N/A	10
2	Монокроталин (40 мг/кг) + IgG в качестве	Антитело изотипического контроля	REGN1945	25 мг/кг	2х/неделя	SC	-1	12

	изотипического контроля							
3	Монокроталин (40 мг/кг) + антитело к PDGF-B	Антитело к PDGF-B	H4H13145P	25 мг/кг	2х/неделя	SC	-1	12
4	Монокроталин (40 мг/кг) + мацитентан	Мацитентан	N/A	30 мг/кг	ежесуточно	P.O.	-1	12

[0271] Схемы введения дозы для исследования 2 представлены в **таблице 14**.

**Таблица 14.** Выживание крыс с тяжелой РАН, которым 5 недель вводили монокроталин, при терапевтической обработке лекарственным средством.

Группа	Условия	Обработка	REGN#	Дозировка	Частота	Путь	День начала	Число крыс/группа
1	Солевой раствор	Солевой раствор	N/A	5 мл/кг	Один раз на 1-е сутки	SC	N/A	10
2	Монокроталин (60 мг/кг) + IgG в качестве изотипического контроля	Антитело изотипического контроля	REGN1945	25 мг/кг	2х/неделя	SC	14	12
3	Монокроталин (60 мг/кг) + антитело к PDGF-B	Антитело к PDGF-B	H4H13145P	25 мг/кг	2х/неделя	SC	14	12

*Катетеризация правых отделов сердца и систолическое давление в правом желудочке*

[0272] Крыс анестезировали изофлураном и удерживали при примерно 37°C с использованием нагреваемой платформы (Heated Hard Pad 1, Braintree Scientific) и циркуляционного водяного насоса с подогревом (T/Pump Classic, Gaymar Industries). Область шеи каждой крысы готовили к хирургическому вмешательству путем депиляции

над правой общей сонной артерией и правой яремной веной. Делали разрез и осторожно изолировали правую яремную вену, чтобы не повредить сонную артерию и/или блуждающий нерв. Кусок шелковой хирургической нити 5-0 помещали под изолированную яремную вену, чтобы обеспечить возможность ретракции сосуда краниально, затем с помощью иглы 23 калибра делали отверстие в яремной вене. Катетер для измерения давления (датчик давления для катетера Micro-tip SPR-1000, Millar Instruments, Inc.) вставляли в отверстие яремной вены и продвигали через правое предсердие в правый желудочек. Катетер присоединяли к прибору для измерения давления/объема (MPVS-300, Millar Instruments, Inc.), который позволяет измерять частоту сердечных сокращений, а также как диастолическое, так и систолическое давление в правом желудочке. Эти параметры были получены в цифровом виде с использованием системы сбора данных (PowerLab 4/35, AD Instruments). Программное обеспечение LabChart Pro 7.0 (AD Instruments) использовали для анализа показателей давления в правом желудочке. Показания были количественно оценены для 60-секундного интервала отслеживания давления (после 2-минутного периода записи, чтобы обеспечить стабилизацию давления). Анализируемые параметры включали показатели систолического давления в правом желудочке (RVSP), частоту сердечных сокращений (HR) и скорость повышения давления в правом желудочке (dP/dt макс.).

#### *Оценка гипертрофии правых отделов сердца*

[0273] После гемодинамических измерений *in vivo*, животных умерщвляли с помощью процедур обескровливания под наркозом, а затем собирали и взвешивали ткань свободной стенки RV, левого желудочка (LV) и сердечной перегородки. Гипертрофию RV рассчитывали по индексу Фултона как соотношение масс RV и (LV+сердечная перегородка). Затем ткань RV сохраняли замороженной (-80 °C) для биохимических анализов.

#### [0274] *Статистические анализы*

[0275] Количественные данные выражены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Данные статистических анализов, проводимых между двумя группами, анализировали с помощью t-критерия. Сравнение данных зависимости от времени анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Сравнение эффекта обработки в нескольких группах обработки, получающих лекарственное средство, анализировали с помощью однофакторного ANOVA. Для всех статистических анализов использовали программное обеспечение Prism. P-значение < 0,05 соответствовало статистической значимости.

#### **Результаты**

*Антитело к PDGF-B обеспечивало лучшую эффективность в отношении двух клинически значимых конечных точек РАН при прямом сравнении с антителом к PDGFR $\beta$*

#### *Изменение массы тела у мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/Sugen*

[0276] У мышей, которых подвергали воздействию гипоксии, наблюдали более медленный рост массы тела за 6 недель, в сравнении с животным в условиях нормоксии.

Обработка антителом к PDGF-B значимо ослабляла потерю массы тела, по сравнению с группой обработки hIgG4 в качестве изотипического контроля. В случае обработки антителом к PDGFR $\beta$  не наблюдали какого-либо влияния на изменение массы тела, обусловленное воздействием гипоксии (**фигура 10**). Значимая разница была обнаружена в момент времени, соответствующий 42-м суткам, только между Hy/Su+IgG в качестве изотипического контроля и Hy/Su+антитело к PDGF-B (\*\*p < 0,01).

*Повышение давления в правом желудочке, индуцированное у мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/Sugen*

[0277] С помощью оценки с использованием катетера показателей давления в правом желудочке сердца было выявлено значимое повышение показателей систолического давления в правом желудочке в группе, обработанной изотипическим антителом, у мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/Sugen на 6-й неделе. Обработка антителом к PDGF-B обеспечивала значимое подавление повышения систолического давления в правом желудочке на 9 мм рт. ст, при этом антитело к PDGFR $\beta$  также снижало систолическое давление в правом желудочке, но в меньшей степени (**фигура 10**). Значимая разница была обнаружена между Hy/Su+IgG в качестве изотипического контроля и Hy/Su+антитело к PDGF-B (\*\*\*\*p<0,0001) и Hy/Su+антитело к PDGFR $\beta$  (\*\*\*\*p<0,0001). Значимая разница была также обнаружена между Hy/Su+PDGFR $\beta$  и Hy/Su+антитело к PDGF-B (\* p<0,05).

*Гипертрофия правого желудочка, индуцированная у мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/Sugen*

[0278] В посмертном анализе массы правых отделов сердца мыши обнаружено значимое изменение у мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/sugen (**фигура 10**). Соотношение массы правого желудочка и массы левого желудочка и сердечной перегородки дает индекс гипертрофии правого желудочка (т. е. индекс Фултона), и в группах с воздействием гипоксии/sugen в течение 6 недель были показаны большие соотношения, по сравнению с животными в условиях нормоксии, что указывает на наличие гипертрофии правого желудочка. Терапевтическая обработка антителом к PDGF-B уменьшала гипертрофию правого желудочка на ~35%, по сравнению с таковой у подвергнутых воздействию гипоксии/sugen мышей, обработанных изотипическим контролем. Применение антитела к PDGFR $\beta$  не смогло уменьшить гипертрофию правого желудочка у животных, подвергшихся воздействию гипоксии/sugen. Значимая разница была обнаружена между Hy/Su+IgG в качестве изотипического контроля и Hy/Su+антитело к PDGF-B (\*\*\*\*p<0,0001) и Hy/Su+антитело к PDGFR $\beta$  (\*p<0,05). Значимая разница была также обнаружена между Hy/Su+PDGFR $\beta$  и Hy/Su+антитело к PDGF-B (\* p<0,05).

[0279] Таким образом, антитело к PDGF-B обеспечивало лучшую эффективность в отношении двух клинически значимых конечных точек (давление в правом желудочке и гипертрофия) РАН при прямом сравнении с антителом к PDGFR $\beta$  у мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/Sugen.

*Профилактическая обработка антителом к PDGF-B обеспечивает мощную защиту*

животных в случае получающей MCT крысы, а терапевтическая обработка антителом к PDGF-B обеспечивает улучшение в отношении выживания в случае крысы, получающей высокую дозу MCT

*Повышение давления в правом желудочке, индуцированное у крыс, которым вводили монокроталин*

[0280] В исследовании 1, с помощью оценки с использованием катетера показателей давления в правом желудочке сердца было выявлено значимое повышение показателей систолического давления в правом желудочке в группе, обработанной изотипическим антителом, у крыс, которым вводили монокроталин, на 4-й неделе. Обработка как сосудорасширяющим средством мацитентаном, так и антителом к PDGF-B, значимо подавляла повышение систолического давления в правом желудочке. Значимая разница была обнаружена между монокроталином+IgG в качестве изотипического контроля и монокроталином+мацитентан (\*\* $p < 0,001$ ) и монокроталином+антитело к PDGF-B (\* $p < 0,05$ ) (**фигура 11**).

*Гипертрофия правого желудочка, индуцированная у крыс, которым вводили монокроталин*

[0281] В посмертном анализе массы правых отделов сердца крысы обнаружено значимое изменение у крыс, которым вводили монокроталин, с обработкой IgG в качестве изотипического контроля. Соотношение массы правого желудочка и массы левого желудочка и сердечной перегородки дает индекс гипертрофии правого желудочка (т. е. индекс Фултона), и в группах у крыс, обработанных монокроталином в течение 4 недель, были показаны большие соотношения, по сравнению с животными, обработанными солевым раствором, что указывает на наличие гипертрофии правого желудочка. Превентивная обработка антителом к PDGF-B уменьшала гипертрофию правого желудочка на ~40%, по сравнению с таковой у крыс, которым вводили монокроталин, с обработкой изотипическим контролем (**фигура 11**). Применение сосудорасширяющего средства мацитентана не смогло уменьшить гипертрофию правого желудочка у крыс, которым вводили монокроталин. Значимая разница была обнаружена между монокроталином+IgG в качестве изотипического контроля и монокроталином+антитело к PDGF-B (\* $p < 0,05$ ).

*Доля выживших животных в случае крыс, которым вводили монокроталин*

[0282] В исследовании 2, у крыс, которым путем инъекции вводили 60 мг/кг монокроталина, развивались тяжелые симптомы легочной гипертензии и наблюдалась высокая смертность. Примечательно, что 90% животных в группе обработки монокроталином и IgG в качестве изотипического контроля умирали к 35-м суткам. Обработку антителом к PDGF-B начинали через 14 суток после инъекции монокроталина, и она значимо ослабляла потерю массы тела животного. Значимая разница была обнаружена между монокроталином+IgG в качестве изотипического контроля и монокроталином+антитело к PDGF-B к 28-м суткам (\* $p < 0,05$ ) и 35-м суткам (\*\* $p < 0,001$ ). Обработка антителом к PDGF-B также обеспечивала спасение 58% крыс от смерти к 35-м суткам. Значимая разница была обнаружена между монокроталином+IgG в качестве

изотипического контроля и монокроталином+антитело к PDGF-B (\*  $p<0,05$ ), и к 35-м суткам наблюдали спасение 58% крыс от смерти (**фигура 12**).

[0283] Таким образом, превентивная обработка антителом к PDGF-B обеспечивала снижение как в отношении гемодинамической конечной точки (систолическое давление в правом желудочке), так и гипертрофии правого желудочка в модели с использованием монокроталина. Терапевтическая обработка антителом к PDGF-B значительно улучшала выживание животных в случае крыс с тяжелой РАН, которым вводили монокроталин.

*Антитело к PDGF-B продемонстрировало эффективность при терапевтической обработке с низкой дозой*

*Повышение давления в правом желудочке, индуцированное у мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/Sugen*

[0284] С помощью оценки с использованием катетера показателей давления в правом желудочке сердца было выявлено значимое повышение показателей систолического давления в правом желудочке в группе, обработанной изотипическим антителом, у мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/Sugen на 6-й неделе. Обработка антителом к PDGF-B значительно подавляла повышение систолического давления в правом желудочке в дозах 1, 3, 10 и 25 мг/кг. Значимая разница была обнаружена между группами Ну/Su+IgG в качестве изотипического контроля и Ну/Su+антитело к PDGF-B при 1 мг/кг (\*  $p<0,05$ ), 3 мг/кг (\* $<0,01$ ); 10 мг/кг (\*\*\*\*  $p<0,0001$ ) и 25 мг/кг (\*\*\*\*  $p<0,0001$ ). Статистически значимой разницы между разными дозами обработок PDGF-B не наблюдалось (**фигура 13А**).

*Гипертрофия правого желудочка, индуцированная у мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/Sugen*

[0285] В посмертном анализе массы правых отделов сердца мыши обнаружено значимое изменение у мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/sugen (**фигура 13А**). Соотношение массы правого желудочка и массы левого желудочка и сердечной перегородки дает индекс гипертрофии правого желудочка (т. е. индекс Фултона), и в группах с воздействием гипоксии/sugen в течение 6 недель были показаны большие соотношения, по сравнению с животными в условиях нормоксии, что указывает на наличие гипертрофии правого желудочка. Терапевтическая обработка антителом к PDGF-B не приводила к изменению гипертрофии правого желудочка, по сравнению с таковой у подвергнутых воздействию гипоксии/sugen мышей, обработанных изотипическим контролем. Значимая разница была обнаружена между группой в условиях нормоксии и всеми группами Ну/Su (####  $p<0,0001$ ).

*Уровни белка PDGF-B и антитела в сыворотке крови у мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/Sugen*

[0286] К 6-й неделе сыворотку крови собирали для анализа циркулирующих в крови белка PDGF-B и антител человека. Уровни циркулирующего PDGF-B были значительно повышены в группе мышей, подвергнутых воздействию гипоксии/Sugen (**фигура 13В**). Измерение IgG человека в сыворотке крови мышей подтверждало, что уровни антитела в



Т) (препарат сравнения для ремоделиро вания сосудов)											
PDGFRb (REGN2176 )	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	25	6	Защит а отсутс твует	25	6	Защита отсутст вует

[0289] Нацеливание на PDGF-B посредством ведущего mAb (H4H13145P) продемонстрировало устойчивую и надежную эффективность в ряде клинически значимых конечных точек РАН (систолическое давление в правом желудочке - RVSP; гипертрофия правого желудочка - RV) в крысиных моделях. Такие эффекты были более впечатляющими, чем любые методы лечения или контрольные показатели на сегодняшний день, включая препарат стандартного лечения, препарат сравнения, проходящий клиническое испытание, и блокирование PDGFRb в собственной лаборатории. Блокатор PDGF-B может обеспечивать эффективную терапию РАН без сосудорасширяющих механизмов.

#### **Пример 11. Оценка безопасности блокирования PDGFR-β**

[0290] Передача сигналов с участием PDGF-B/PDGFRb вовлечена в пролиферацию, миграцию, выживание и прикрепление перицитов. Прорастающие эндотелиальные клетки секретируют PDGF-B, который связывается со специфическим для перицитов рецептором PDGFRb, что приводит к привлечению и прикреплению перицитов. Нарушение передачи сигналов с участием PDGF-B/PDGFRb приводит в результате к нарушению привлечения перицитов и уменьшению покрытия микрососудов перицитами, что в конечном итоге приводит к гиперплазии эндотелия, аномальному морфогенезу сосудов и образованию микроаневризм. У мышей с абляцией эндотелиального PDGF-B плотность перицитов составляла <52% от нормальной, что приводило к вариabельному диаметру капилляров и вен, регрессии капиллярных ветвей. Специфическая сверхэкспрессия PDGF-B в фоторецепторных клетках приводила к повышенной пролиферации перицитов, но также астроцитов и эндотелиальных клеток. Продолжительное лечение антагонистом PDGF-B, в сравнении с PDGF-Rb, потенциально может вызвать потерю перицитов/повреждение сосудов и последующий отек и кровоизлияние у людей. Кроме того, сообщалось о системной токсичности пегилированного ди-Fab к PDGFRβ (Celltech/Zymogenetics) у людей (периферический отек у пациентов с раком), и безопасность долгосрочной терапии антителом к PDGF-B остается неизвестной.

[0291] Авторы данного изобретения предположили, что специфическое

блокирование PDGF-B-лиганда позволит продолжить передачу сигналов рецептора через оставшиеся лиганды PDGF и приведет к менее негативному влиянию на гомеостаз перицитов. Было обнаружено, что системное s.c. введение ab к PDGF-B при 3 мг/кг не вызывало потери перицитов сосудов сетчатки у новорожденных мышей, тогда как ab к PDGFRb полностью истощало перициты сосудов сетчатки. Было замечено, что у взрослых грызунов наблюдается переносимость лечения высокими дозами антитела к PDGF-B и PDGFRb. Кроме того, 8 месяцев обработки высокой дозой антитела к PDGFRb у взрослых мышей не индуцировало какого-либо повреждения сосудов, кровотечения или выраженного отека.

[0292] В случае анализа эффекта антител к PDGF-B в отношении сосудистой системы сетчатки мышей P2 дикого типа, эффекта в отношении покрытия перицитами в обработанных антителом к PDGF BB сетчатках при дозировке 3 мг/кг не наблюдалось. Хотя системная доставка антитела к PDGF-R $\beta$  (2C5, REGN764) приводила к эффективному истощению перицитов, в случае антител к PDGF-BB (H4H13132P и H4H13145P) не наблюдали выраженного эффекта в модели развития сосудов сетчатки (RVD) при 3 мг/кг (**фигура 14**).

[0293] Для определения эффекта антител к PDGF-B в отношении сосудистой системы сетчатки у мышей P2 WT, антитела к PDGF-B вводили путем инъекции при P2; и ткань собирали при P5. Для выявления перицитов сосудов все сетчатки инкубировали с антителом к NG2. Наблюдали, что более высокая доза антитела к PDGF-B (H4H13145P) проявляет умеренный эффект в отношении истощения перицитов в модели RVD (**фигура 15**).

[0294] Соответственно, это исследование демонстрирует, что применение антител к PDGF-B обеспечивает лучший профиль безопасности, чем применение антител к PDGFR- $\beta$ , и специфическое блокирование PDGF-B-лиганда позволит продолжить передачу сигналов рецептора через оставшиеся лиганды PDGF с целью сохранения функциональности перицитов.

### **Пример 12. Фармакокинетический профиль антител к PDGF-B**

[0295] Фармакокинетический (PK) профиль антител к PDGF-B определяли у мышей C57BL/6 WT в трех разных дозах. Оба моноклональных антитела к PDGF-B, используемых в этом исследовании, перекрестно связывают PDGF-BB мыши с субнаномолярной аффинностью при 37 °C. Самкам мышей возрастом двадцать шесть недель (всего=36 мышей; WT на фоне 100% C57BL/6) вводили однократную подкожную дозу 0,1, 1 или 10 мг/кг, и проводили анализ в моменты времени, соответствующие забору крови, через 6 часов, на 1-е сутки, на 2-е сутки, на 3-и сутки, на 4-е сутки, на 7-е сутки, на 10-е сутки, на 15-е сутки, на 22-е сутки и на 30-е сутки. Общий IgG человека определяли с помощью Gугос: mAb мыши к константной области легкой каппа-цепи человека (REGN654\*биотин) для захвата/mAb мыши к IgG1/IgG4 человека (REGN2567\*Alexa647) для выявления. Функциональное связывание определяли с помощью Gугос: антитело мыши к PDGF-BB\*биотин для захвата/mAb мыши к IgG1/IgG4 человека (REGN2567\*Alexa647) для

выявления.

[0296] Дозы антител к PDGF-B и hIgG4 в качестве изотипического контроля, используемые в фармакокинетическом исследовании, описаны в **таблице 16**.

**Таблица 16**

Тестируемый препарат	hPDGF-BB K <sub>D</sub> при 37 °C *	mPDGF-BB K <sub>D</sub> при 37 °C *	Изотип	Мишень	Доза	n
H4H13145P	1,36E-12	<u>9,54E-13</u>	hIgG4 <sup>P</sup>	Антитело к PDGF-B	10 мг/кг	4
					1 мг/кг	4
					0,1 мг/кг	4
H4H13132P	1,84E-12	<u>8,67E-11</u>	hIgG4 <sup>P</sup>	Антитело к PDGF-B	10 мг/кг	4
					1 мг/кг	4
					0,1 мг/кг	4
REGN1945	-	-	hIgG4 <sup>P</sup>	Антитело к Fel d 1 hIgG4 <sup>P</sup> в качестве изотипического контроля	10 мг/кг	4
					1 мг/кг	4
					0,1 мг/кг	4

[0297] В целом, между H4H13145P и H4H13132P наблюдались различия (**фигура 16**). H4H13145P характеризуется более быстрым выведением, чем изотипический контроль, при 1 мг/кг и 0,1 мг/кг; и имеет РК-профиль, подобный таковому изотипического контроля при 10 мг/кг. H4H13132P характеризуется РК-профилем, подобным таковому изотипического контроля при всех дозах. Наибольшие различия в экспозиции лекарственного средства (AUC<sub>last</sub>) наблюдаются при 1 мг/кг и 0,1 мг/кг, по сравнению с H4H13145P. Все тестируемые моноклональные антитела достигали подобных C<sub>max</sub> в каждой соответствующей дозе. Однако более низкая, чем ожидалось, C<sub>max</sub> наблюдалась для всех трех моноклональных антител, введенных в дозе 0,1 мг/кг.

[0298] Выведение, наблюдаемое для H4H13145P при 1 мг/кг и 0,1 мг/кг, позволяет предположить опосредованное мишенью выведение, которое может быть обусловлено субпикомолярной аффинностью к mPDGF-BB. Важно отметить, что значения аффинности в отношении hPDGF-BB каждой молекулы очень схожи, тогда как в аффинности между молекулами, связывающими mPDGF-BB, имеют место различия.

[0299] Анализы функционального (PDGF-BB мыши) связывания можно осуществлять для изучения концентраций несвязанного антитела в сравнении с общими концентрациями hIgG.

[0300] Подобное исследование проводят на яванских макаках с целью оценки РК-профиля антител к PDGF. Яванским макакам (всего=27) вводят однократную подкожную дозу 0,1, 1 или 10 мг/кг, и проводят анализ в моменты времени, соответствующие забору крови, через 6 часов, на 1-е сутки, на 2-е сутки, на 3-и сутки, на 4-е сутки, на 7-е сутки, на 10-е сутки, на 15-е сутки, на 22-е сутки и на 30-е сутки. Для РК-анализа с целью определения конечных точек в виде уровня мишени (общий связанный и несвязанный PDGF-B), уровня hFc (общий) и уровня свободной мишени (свободный PDGF-B) для антител собирают плазму крови.

**Пример 13. Исследование антител к PDGF-B в отношении проницаемости сосудов**

[0301] Считается, что патобиологический механизм ангионевротического отека в контексте терапии ингибитором ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ) (каптоприл) связан с эффекторной калликреин-кининовой системой плазмы крови (см. Craig *et al.*, 2014 *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;165(2):119-27; которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Ангионевротический отек может возникать из-за неадекватной деградации брадикинина (БК). БК имеет очень короткий период полувыведения 17 секунд, поскольку он быстро метаболизируется различными металлопротеиназами, такими как АСЕ. Ингибитор АСЕ, каптоприл, путем блокирования распада брадикинина повышает уровни брадикинина и приводит в результате к вазодилатации и повышению проницаемости сосудов.

[0302] Было проведено исследование, чтобы оценить, оказывает ли длительная обработка здоровых взрослых мышей C57 высокими дозами антител к PDGF-BB какое-либо дополнительное влияние на гиперпроницаемость сосудов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), легких или головного мозга. Самцам мышей Taconic C57BL возрастом 11-16 недель вводили подкожную дозу 25 мг/кг контрольного IgG, антитела к PDGF-B и антител к PDGFR $\beta$  два раза в неделю, в течение 4 недель, как описано на **фигуре 17**. Анализ с применением голубого Эванса (ЕВ) использовали для оценки влияния 4-недельной обработки антителом к PDGF-B и антител к PDGFR $\beta$  на исходном уровне и проницаемость сосудов ЖКТ, индуцированную ингибитором АСЕ II. Краситель голубой Эванс (ЕВ) обратимо связывается с сывороточным альбумином со средней аффинностью и имеет большой период полувыведения из крови. Связывание ЕВ с альбумин использовалось для количественной оценки утечки белка как показателя повышенной проницаемости сосудов. В физиологических условиях эндотелий непроницаем для альбумина, поэтому связанный с голубым Эванса альбумин остается ограниченным в кровеносных сосудах. При патологических состояниях, способствующих повышению проницаемости сосудов, эндотелиальные клетки частично теряют свои тесные контакты, и эндотелий становится проницаемым для небольших белков, таких как альбумин. Органы с повышенной проницаемостью будут демонстрировать значительно повышенную степень окрашивания голубым красителем по сравнению с органами с интактным эндотелием. Уровень проницаемости сосудов можно оценить простой визуализацией или количественным

измерением красителя, включенного на миллиграмм ткани.

[0303] **На фигуре 18** показано, что введение дозы антитела к PDGF-B и антител к PDGFR $\beta$  не оказывало значимого влияния на увеличение массы тела животного. Кроме того, не наблюдалось никаких изменений в поведении животных.

[0304] Кроме того, как продемонстрировано на **фигуре 19**, у здоровых мышей отсутствовало значимое изменение в отношении задержки жидкости в ЖКТ/отека в тонкой кишке после обработки IgG в качестве изотипического контроля, антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ . Каптоприл вызывал легкое и статистически незначимое увеличение сырой массы в тонкой кишке. Обработка IgG в качестве изотипического контроля, антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$  не приводила к значимому изменению в отношении отека ткани в тонкой кишке, вызванного каптоприлом. Аналогичным образом, **на фигуре 20** показано, что у мышей отсутствовало значимое изменение в отношении проницаемости сосудов в тонкой кишке при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ . Обработка антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$  не ухудшала вызванную каптоприлом острую гиперпроницаемость сосудов тонкой кишки.

[0305] Кроме того, как продемонстрировано на **фигуре 21**, у здоровых и обработанных каптоприлом мышей отсутствовало значимое изменение в отношении задержки жидкости в ЖКТ/отека в желудке при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ . Каптоприл не вызывал статистически значимого увеличения сырой массы в желудке. Аналогичным образом, **на фигуре 22** показано, что у мышей отсутствовало значимое изменение в отношении проницаемости сосудов в желудке при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ . Обработка антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$  не ухудшала вызванную каптоприлом острую гиперпроницаемость сосудов желудка.

[0306] **На фигуре 23** представлены результаты, демонстрирующие, что у здоровых и обработанных каптоприлом мышей отсутствовало значимое изменение в отношении задержки жидкости в ЖКТ/отека в легких при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ . Каптоприл не вызывал значимого увеличения массы легкого. Аналогичным образом, как продемонстрировано на **фигуре 24**, у здоровых и обработанных каптоприлом мышей отсутствовало значимое изменение в отношении проницаемости сосудов в легких при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ . Кратковременная обработка каптоприлом не вызывала гиперпроницаемость сосудов в легких.

[0307] Кроме того, на **фигуре 25** представлены результаты, демонстрирующие, что у здоровых и обработанных каптоприлом мышей отсутствовало значимое изменение в отношении задержки жидкости в ЖКТ/отека в головном мозге при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ . Каптоприл не вызывал значимого увеличения массы в головном мозге. Аналогичным образом, как продемонстрировано на **фигуре 26**, у здоровых и обработанных каптоприлом мышей отсутствовало значимое изменение в отношении проницаемости сосудов в головном мозге при обработке антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$ . Кратковременная обработка каптоприлом не вызывала гиперпроницаемость

сосудов в головном мозге.

[0308] В целом, обработка антителом к PDGF-B и антителами к PDGFR $\beta$  не вызывала у мышей какого-либо значимого изменения в отношении отека ткани и проницаемости сосудов ЖКТ. Следовательно, нейтрализующие антитела к PDGF-B и PDGFR $\beta$  не оказывают отрицательного влияния на проницаемость сосудов ЖКТ взрослых мышей. Кроме того, результаты этого исследования позволяют предположить, что PDGF-B-сигнал может быть незаменимым для поддержания целостности перицитов сосудистой системы мышей.

**Пример 14. Показатели кинетики связывания для связывания моноклонального антитела к PDGF-BB с PDGF-BB человека, PDGF-BB обезьяны и PDGF-BB крысы в Biacore при 25 °C**

[0289] Равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) для связывания PDGF-BB с разными моноклональными антителами к PDGF-BB (mAb) определяли, используя биосенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с использованием прибора Biacore T200 или MASS-2. Все исследования по связыванию осуществляли в подвижном буфере, включающем 10 mM HEPES, 300 mM NaCl и 0,05% об./об. поверхностно-активное вещество Tween-20, уровень pH 7,4 (HBS-P) при 25 °C. Поверхность сенсорного чипа сперва дериватизировали путем сочетания по аминокруппе со специфическим в отношении Fc человека mAb мыши (REGN2567) для захвата разных mAb к PDGF-BB. Путем впрыскивания разных концентраций (90- 1,11 нМ, 3-кратное серийное разведение) PDGF-BB человека, PDGF-BB обезьяны (*Macaca fascicularis*) или PDGF-BB крысы, приготовленных в подвижном буфере HBS-P, покрывали поверхность с захваченным mAb к PDGF-BB в течение 1-3 минут при скорости потока 25-50 мкл/мин и отслеживали их диссоциацию в подвижном буфере HBS-P в течение 5-10 минут. В конце каждого цикла поверхность с захваченным mAb к PDGF-BB регенерировали с использованием 10-12-секундного введения 20 mM фосфорной кислоты.

[0290] Скорость ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем аппроксимации кривых сенсограмм, записываемых в режиме реального времени, к модели связывания 1:1 с ограничением по движению масс с использованием программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0c. Равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) и полупериод диссоциации ( $t^{1/2}$ ) рассчитывали исходя из кинетических констант скорости как:

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

Параметры кинетики связывания для связывания PDGF-BB с разными mAb к PDGF-BB по данному изобретению при 25°C описаны в **таблицах 17-19**.

*Результаты*

**Таблица 17.** Параметры кинетики связывания разных моноклональных антител к PDGF-BB.

(mAb) связывание с PDGF-BB человека при 25 °C.

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	15 нМ связанного hPDGF-BB (RU)	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)	$t^{1/2}$ (мин)
H4H13132P	287,1±1,1	49,9	3,01E+06	5,30E-05	1,76E-11	218
H4H13145P	170,9±2,1	39,5	2,88E+06	1,00E-5*	3,47E-12	≥1155

\* Указывает на то, что диссоциация mAb к PDGF-BB в условиях текущего эксперимента не наблюдалась, и значение  $k_d$  было зафиксировано на уровне 1,00E-05.

**Таблица 18.** Параметры кинетики связывания для связывания разных моноклональных антител к PDGF-BB (mAb) с PDGF-BB обезьяны при 25 °С.

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	30 нМ связанного mfPDGF-BB (RU)	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)	$t^{1/2}$ (мин)
H4H13132P	257,6 ± 1,5	50,3	4,31E+06	4,17E-05	9,67E-12	277,2
H4H13145P	300,1 ± 13,5	73,4	9,30E+05	1,50E-05	1,61E-11	769,7

**Таблица 19.** Параметры кинетики связывания для связывания разных моноклональных антител к PDGF-BB (mAb) с PDGF-BB крысы при 25 °С.

Захваченные mAb	Уровень захвата mAb (RU)	15 нМ связанного rPDGF-BB (RU)	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)	$t^{1/2}$ (мин)
H4H13132P	286,3±0,1	42,7	2,75E+06	2,82E-04	1,03E-10	41,0
H4H13145P	167,3±1,0	35,3	2,25E+06	2,82E-04	1,25E-10	40,9

**Пример 15.** Тестирование ингибирования с помощью антитела потока кальция, индуцированного PDGF-BB, PDGF-AB человека или комбинацией PDGF-BB/AB, с помощью FLIPR с использованием первичных гладкомышечных клеток легочной артерии человека и первичных фибробластов легких человека.

[0239] Для анализа потока кальция, первичные гладкомышечные клетки легких человека (Lonza, № по каталогу CC-2581) и фибробласты легких человека (Lonza, № по каталогу 2512) высевали в 96-луночные планшеты для анализа при плотности клеток 10 тыс./лунка. Гладкомышечные клетки культивировали в рекомендуемой поставщиком среде для культивирования гладкомышечных клеток (Lonza, CC-3182) и фибробласты культивировали в DMEM-10%FBS-1x пенициллин/стрептомицин/L-глутамин в увлажненном инкубаторе при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>.

[0240] При достижении 100% конфлюентности в лунке, оценивали обусловленный PDGF поток кальция с помощью набора для анализа FLIPR® Calcium 5 (Molecular Devices, № по каталогу R8185) в системе FLIPR Tetra (Molecular Devices) в соответствии с протоколом от производителя. Вкратце, полную среду замещали 50 мкл среды для анализа (DMEM-0,1% BSA-1x пенициллин/стрептомицин/L-глутамин). Затем краситель из Calcium 5 восстанавливали в прилагаемом буфере в присутствии пробенецида (ThermoFisher, № по каталогу P36400). Затем к клеткам добавляли 50 мкл восстановленного красителя из Calcium 5 и инкубировали в течение 1 часа при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> перед помещением в систему FLIPR Tetra. PDGF-BB человека (R&D Systems, № по каталогу 220-GMP), PDGF-AB человека (R&D Systems, № по каталогу 222-AB) и PDGF-AB/PDGF-BB использовали в соотношении 3:1 для получения отдельных планшетов для дозирования. Для оценки ингибирования с помощью антитела в качестве константы была выбрана концентрация 1 нМ PDGF-AB, PDGF-BB и комбинированной обработки PDGF-AB/BB. В присутствии 1 нМ белков PDGF тестировали H4H13145P или H4H13132P в диапазоне от 500 нМ до 0,06 нМ (серийное разведение 1:6). Антитела предварительно инкубировали с белками PDGF в течение 30 минут перед добавлением к клеткам с помощью системы FLIPR. Следы потока кальция оценивали как через 60 секунд, так и в течение всего 5-минутного периода. Эти следы кальция анализировали в отношении их макс.-мин. значений с использованием программного обеспечения SoftMax Pro (Molecular Devices).

[0241] Как показано в **таблице 20**, оба антитела, H4H13145P и H4H13132P, продемонстрировали полное ингибирование 1 нМ PDGF-BB, PDGF-AB и PDGF-AB/BB (3:1) при регистрации потока кальция в гладкомышечных клетках легких человека в течение 60 секунд. Оба антитела продемонстрировали ингибирование 1 нМ при всех обработках PDGF со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,18 нМ до 4,5 нМ. H4H13145P продемонстрировало более высокую эффективность в отношении PDGF-BB, чем H4H13132P, с IC<sub>50</sub> 0,18 нМ и 0,64 нМ соответственно. Эти антитела являются более сильными ингибиторами PDGF-BB отдельно, чем PDGF-AB и комбинации PDGF-AB/BB (3:1).

[0242] При регистрации потока кальция в течение всего 5-минутного периода, H4H13145P продемонстрировало более высокую способность нейтрализовать PDGF-BB и препятствовать обусловленному PDGF потоку кальция по сравнению с H4H13132P. H4H13145P сохраняло сильное ингибирование при всех обработках PDGF с IC<sub>50</sub> 0,36 нМ для ингибирования PDGF-BB, 16 нМ для ингибирования PDGF-AB и 5,7 нМ для комбинации PDGF-AB/BB (3:1). Антитело изотипического контроля не продемонстрировало ингибирования PDGF-опосредованного потока кальция.

**Таблица 20.** Ингибирование антителом к PDGF-BB активации PDGF-BB, AB или AB/BB в клеточном анализе с использованием первичных клеток (гладкомышечные клетки легочной артерии).

Белки PDGF	PDGF-BB человека	PDGF-AB человека	PDGF-AB/BB человека (3:1)

Тип клеток	Клетки PASM		Клетки PASM		Клетки PASM	
EC <sub>50</sub> [M]	3,80E-10		9,20E-10		6,00E-10	
Константная концентрация	1 нМ		1 нМ		1 нМ	
<b>Момент времени 60 секунд</b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>	<b>(%) Ингибирования</b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>	<b>(%) Ингибирования</b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>	<b>(%) Ингибирования</b>
H4H13145P (45P)	1,80E-10	96%	1,50E-09	99%	1,20E-09	99%
H4H13132P (32P)	6,40E-10	96%	2,10E-09	100%	4,50E-09	100%
Изотипически й контроль	Ингибирование отсутствует		Ингибирование отсутствует		Ингибирование отсутствует	
<b>Весь период времени</b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>	<b>(%) Ингибирования</b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>	<b>(%) Ингибирования</b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>	<b>(%) Ингибирования</b>
H4H13145P (45P)	3,60E-10	97%	1,10E-08	91%	5,70E-09	89%
H4H13132P (32P)	6,60E-09	92%	1,20E-07	70%	3,30E-07	72%
Изотипически й контроль	Ингибирование отсутствует		Ингибирование отсутствует		Ингибирование отсутствует	

PASM - гладкомышечные клетки легочной артерии человека

[0291] В случае тестирования в фибробластах легких человека, H4H13145P и H4H13132P продемонстрировали полное ингибирование при всех обработках PDGF при регистрации потока кальция в течение 60 секунд. Оба антитела продемонстрировали ингибирование 1 нМ при обработках PDGF со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,59 нМ до 1,6 нМ. H4H13145P продемонстрировало несколько более высокую эффективность в отношении нейтрализации PDGF-BB по сравнению с H4H13132P, с IC<sub>50</sub> 0,59 нМ и 0,99 нМ соответственно. H4H13145P также было несколько сильнее в отношении нейтрализации при комбинированной обработке PDGF-AB/BB, чем H4H13132P, со значением IC<sub>50</sub> 0,16 нМ и 0,54 нМ соответственно. Эти антитела являются более сильными ингибиторами PDGF-BB отдельно, чем PDGF-AB и комбинированной обработки PDGF-AB/BB.

[0292] При регистрации потока кальция в течение всего 5-минутного периода, H4H13145P продемонстрировало значимо более высокую способность нейтрализовать PDGF-BB, PDGF-AB и комбинированную обработку PDGF-AB/BB по сравнению с

H4H13132P. H4H13132P продемонстрировало более низкую способность в отношении максимального ингибирования константной концентрации 1 нМ при всех обработках PDGF. H4H13145P показало более высокую эффективность в отношении ингибирования обусловленного PDGF-BB потока кальция по сравнению с H4H13132P, с IC<sub>50</sub> 0,63 нМ и 3,8 нМ соответственно. Антитело изотипического контроля не продемонстрировало ингибирования PDGF-опосредованного потока кальция в фибробластах легких человека.

**Таблица 21.** Ингибирование антителом к PDGF-BB активации PDGF-BB, AB или AB/BB в клеточном анализе с использованием первичных клеток (фибробласты).

Белки PDGF	PDGF-BB человека		PDGF-AB человека		PDGF-AB/BB человека (3:1)	
Тип клеток	Клетки HLF		Клетки HLF		Клетки HLF	
EC <sub>50</sub> [M]	2,40E-10		6,50E-10		5,50E-10	
Константная концентрация	1 нМ		1 нМ		1 нМ	
<b>Момент времени 60 секунд</b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>	<b>(%) Ингибирования</b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>	<b>(%) Ингибирования</b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>	<b>(%) Ингибирования</b>
H4H13145P (45P)	5,90E-10	100%	1,00E-09	100%	1,60E-10	100%
H4H13132P (32P)	9,90E-10	100%	1,60E-09	100%	5,40E-10	100%
Изотипический контроль	Ингибирование отсутствует		Ингибирование отсутствует		Ингибирование отсутствует	
<b>Весь период времени</b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>	<b>(%) Ингибирования</b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>	<b>(%) Ингибирования</b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>	<b>(%) Ингибирования</b>
H4H13145P (45P)	6,30E-10	100%	2,10E-08	100%	1,10E-09	100%
H4H13132P (32P)	3,80E-09	97%	4,30E-07	63%	5,50E-09	87%
Изотипический контроль	Ингибирование отсутствует		Ингибирование отсутствует		Ингибирование отсутствует	

**Пример 16.** Структурный анализ комплекса антитело-PDGF-BB с помощью криогенной электронной микроскопии (крио-ЭМ)

Способы

### *Получение Fab-фрагмента*

[0309] IgG H4H13145P, H4H13132P и H4H13127P расщепляли на F(ab')<sup>2</sup>- и Fc-фрагменты с использованием фермента Fabricator (Genovis) в соответствии со стандартными протоколами от производителя. F(ab')<sup>2</sup> восстанавливали до Fab с использованием 2-меркаптоэтиламина (2-MEA, ThermoFisher) с последующим удалением Fc-фрагмента с использованием аффинной смолы CaptureSelect IgG-Fc (ms) (ThermoFisher). Fab-фрагменты затем очищали путем введения в колонку для эксклюзионной хроматографии (SEC) (Superdex 200 Increase 15/300 GL, GE healthcare), соединенную с хроматографической системой АКТА Avant 25 (GE healthcare), при этом подвижный буфер содержал 50 mM Tris-HCl, уровень pH 7,5, 150 mM NaCl. Пиковые фракции объединяли и концентрировали в отсекающем по 30 кДа центрифужном фильтре (Millipore Sigma) для последующего применения в получении комплексов.

### *Получение комплексов*

[0310] Рекombинантный белок PDGF-BB человека (R&D) смешивали с Fab H4H13145P или Fab H4H13132P при молярном отношении 1:2,2. Избыток неконкурирующего Fab H4H13127P был дополнительно добавлен к двум образцам для увеличения размера двух комплексов, что делает их более подходящими мишенями для ЭМ-характеристики. Этот дополнительный Fab также способен улучшать распределение ориентации частиц комплексов на сетке EM. Образцы инкубировали при 4°C в течение 30 минут до концентрирования в отсекающем по 30 кДа центрифужном фильтре (Millipore Sigma) до достижения концентрации 2,5 мг/мл, измеряемой с использованием прибора Nanodrop (ThermoFisher).

### *Подготовка образца для крио-ЭМ и сбор данных*

[0311] Свежеприготовленный комплекс PDGFBB - Fab H4H13145P - Fab H4H13127 или комплекс PDGFBB - Fab H4H13132P - Fab H4H13127 смешивали с ~0,15% Amphipol PMAL-C8 (Anatrace) непосредственно перед внесением с помощью пипетки 3,5 мкл смеси на сетку UltraAufoil R1.2/1.3, 300 меш (Quantifoil). Избыток жидкости удаляли с помощью фильтровальной бумаги, и сетку погружали замороженным виде в жидкий этан, охлаждаемый жидким азотом, с использованием Vitrobot Mark IV (ThermoFisher), работающего при 4°C и 100% влажности. Затем сетку загружали в микроскоп Titan Krios G3i (ThermoFisher), оснащенный камерой K3 (Gatan). Получали ~7000 видео в режиме с подсчетом при заданном увеличении 105000x (размер пикселя 0,86 Å) для обоих комплексов с использованием программного обеспечения EPU (ThermoFisher). Каждое видео содержало 46 фракций дозы за 2-секундную экспозицию и общая полученная доза на Å<sup>2</sup> составляла ~40 электронов.

### *Обработка данных крио-ЭМ и получение карты*

[0312] Данные крио-ЭМ обрабатывали с использованием Cryosparc v2.14.2. Видео были подвергнуты коррекции движения с помощью коррекции движения Patch и параметры CTF были оценены с помощью оценки CTF Patch. Первоначально частицы были выбраны с использованием функции Blob Picker для получения средних значений 2D-класса,

которые будут использоваться в качестве шаблонов для последующего выбора шаблонов. После нескольких раундов 2D-классификации с целью удаления не представляющих интерес частиц было оставлено 249832 и 429948 частиц для комплекса PDGFBB - Fab H4H13145P - Fab H4H13127 и комплекса PDGFBB - Fab H4H13132P - Fab H4H13127 соответственно. С помощью реконструкции Ab initio, гомогенного уточнения и гетерогенного уточнения было идентифицировано 110261 частица, соответствующая комплексу PDGFBB - Fab H4H13145P - Fab H4H13127, и 159372 частицы, соответствующие комплексу PDGFBB - Fab H4H13132P - Fab H4H13127. Используя неоднородное уточнение, эти частицы были дополнительно уточнены до реконструкций с разрешением 3,4 Å и 3,5 Å для двух комплексов соответственно.

#### *Построение и уточнение модели*

[0313] Построение модели вручную осуществляли, используя Coot версии 0.8.9, и уточнения действительного пространства выполняли в Phenix версии 1.17. Кристаллическая структура PDGF-BB человека (PDB: 1PDG) была подогнана к крио-ЭМ картам плотности для комплекса PDGFBB - Fab H4H13145P - Fab H4H13127 и комплекса PDGFBB - Fab H4H13132P - Fab H4H13127 с использованием функции подгонки к картам в UCSF Chimera. Модели гомологии для Fab-фрагментов H4H13145P, H4H13132P и H4H13127P создавали на основе ранее определенной структуры REGN Fab. Точной подгонке Fab-моделей к их соответствующим плотностям способствовали четко интерпретируемые плотности боковых цепей, соответствующие их различным последовательностям CDR. После докинга, модели корректировали вручную в Coot с последующим уточнением в отношении действительного пространства целого комплекса PDGFBB - Fab H4H13145P - Fab H4H13127 или комплекса PDGFBB - Fab H4H13132P - Fab H4H13127 в Phenix.

#### Результаты

[0314] PDGFBB-лиганд является гомодимером, содержащим две области «зажима», образуемые тремя межнитевыми петлями (L1 образуется остатками 25-38, L2 образуется остатками 53-58 и L3 образуется остатками 78-81), за которыми следуют С-концевые сегменты.

[0315] Согласно крио-ЭМ исследованиям, каждый гомодимер PDGFBB связывается с двумя молекулами Fab H4H13145P или H4H13132P и двумя молекулами Fab H4H13127P. Оба комплекса имеют симметрию 2-го порядка с двумя молекулами Fab H4H13127P, связывающимися с внешним краем области β-листа. Как Fab H4H13145P, так и Fab H4H13132P связываются с тремя межнитевыми петлями, которые также взаимодействуют с PDGFRβ в составе сигнального комплекса PDGFBB - PDGFRβ (PDB: 3MJG), с аналогичным сайтом связывания. Данные позволяют предположить, что антитела H4H13145P и H4H13132P связываются на концах димера PDGFBB, и один Fab вступает в контакт с обоими мономерами в димере, т. е. антитело связывается через поверхность димера.

[0316] H4H13145P: как тяжелая цепь, так и легкая цепь H4H13145P

взаимодействуют с димером PDGFBB через три межкнитевые петли.

[0317] Взаимодействия антитела с димером: CDR H1, H2 и H3 в тяжелой цепи (остатки A31, Y32, W50, Y54, N57, W100) вовлечены во взаимодействия с обоими цепями гомодимера PDGFBB. CDR L3 в легкой цепи (остатки Y91, Y92, N93, L94 и F96) вовлечены во взаимодействия с цепью 1 димера PDGFBB.

[0318] Взаимодействия димера с антителом: Цепь 1 PDGFBB (остатки F37, W40, R73, K80, K81, P82, F84 и K86) взаимодействует с обеими цепями H4H13145P. Остатки I13 и R56 в цепи 2 PDGFBB вовлечены во взаимодействия с тяжелой цепью H4H13145P. Петля 1 и петля 3 в цепи 1 играют важную роль во взаимодействиях.

[0319] H4H13132P: как тяжелая цепь, так и легкая цепь H4H13132P взаимодействуют с димером PDGFBB через три межкнитевые петли.

[0320] Взаимодействия антитела с димером: CDR H1, H2 и H3 в тяжелой цепи (остатки S31, A33, I52, I54, F55, D103, Y104, Y105) вовлечены во взаимодействия с обоими цепями димера PDGFBB. CDR L1 и L3 в легкой цепи (остатки Y31, T97 и W99) вовлечены во взаимодействия с цепью 1 димера PDGFBB.

[0321] Взаимодействия димера с антителом: Цепь 1 PDGFBB (остатки L38, W40, R73, I75, K80, K81, P82, I83, F84 и K86) взаимодействует с обеими цепями H4H13132P. Остаток R56 в цепи 2 PDGFBB вовлечен во взаимодействия с тяжелой цепью H4H13132P. Петля 1 и петля 3 в цепи 1 играют важную роль во взаимодействиях.

#### Обсуждение

[0322] Данные крио-ЭМ показывают, что два антитела, H4H13145P и H4H13132P, имеют почти идентичные сайты связывания на димере PDGFBB. Множественные остатки в пределах цепи 1 PDGFBB взаимодействуют с обоими антителами (W40, R73, K80, K81, P82, F84 и K86). Взаимодействия между цепью 2 PDGFBB и антителами проявляются в меньшей степени (два для H4H13145P и один для H4H13132P), однако оба взаимодействия имеют общий остаток R56.

**Пример 17. Тестирование в отношении ингибирования с помощью антитела или малых молекул потока кальция, индуцированного PDGF-BB, PDGF-AA или PDGF-DD человека, с использованием FLIPR или по клеточной пролиферации в первичных гладкомышечных клетках легочной артерии человека.**

#### Реагенты

[0323] Реагенты, используемые для тестирования в отношении ингибирования с помощью антитела или малых молекул потока кальция, индуцированного PDGF-BB, PDGF-AA или PDGF-DD человека, с использованием FLIPR или по клеточной пролиферации в первичных гладкомышечных клетках легочной артерии человека, включают следующее: гладкомышечные клетки легочной артерии человека (PASMC), Lonza, № по каталогу CC-2581, № партии 0000559495; среда для культивирования гладкомышечных клеток, Lonza, CC-3182; среда DMEM, Thermofisher, № по каталогу 11965092; раствор бычьего сывороточного альбумина, Millipore-Sigma, № по каталогу A9576; PDGF-BB, R&D Systems, № по каталогу 220-GMP; PDGF-AA, R&D Systems, № по каталогу 221-AA; PDGF-DD, R&D

Systems, № по каталогу 1159-SB; набор для анализа Calcium 5, Molecular Devices, № по каталогу R8185; пробенецид, Thermofisher, № по каталогу P36400; сералутиниб (GB002), MedChemExpress, № по каталогу HY-109190; и иматиниба мезилат, MedChemExpress, № по каталогу HY-50946.

#### Процедуры экспериментов

[0324] Для анализов потока кальция и пролиферации первичные гладкомышечные клетки легких человека высевали в 96-луночные планшеты для анализа при плотности клеток 10000/лунка и 2000/лунка соответственно. Гладкомышечные клетки культивировали в рекомендуемой поставщиком среде для культивирования гладкомышечных клеток в увлажненном инкубаторе при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>.

[0325] При достижении 100% конфлюентности в каждой лунке, оценивали обусловленный PDGF поток кальция с помощью набора для анализа FLIPR® Calcium 5 в системе FLIPR Tetra (Molecular Devices) в соответствии с протоколом от производителя. Вкратце, полную среду замещали 50 мкл среды для анализа (DMEM-0,1% BSA-1x пенициллин/стрептомицин/L-глутамин). Затем краситель из Calcium 5 восстанавливали в прилагаемом буфере в присутствии пробенецида. Затем к клеткам добавляли 50 мкл восстановленного красителя из Calcium 5 и инкубировали в течение 1 часа при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> перед помещением в систему FLIPR Tetra. Серийные разведения PDGF-AA, PDGF-BB и PDGF-DD человека и константы ингибирования получали в отдельных планшетах для дозирования. Концентрацию PDGF-BB 0,5 нМ, концентрацию PDGF-DD 1 нМ и концентрацию PDGF-AA 3 нМ выбирали как константы для оценки ингибирования с помощью антитела и малых молекул. Серийное разведение H4H13145P (антитело к PDGFb) и H4H1238N (изотипический контроль) (от 250 нМ до 0,2 нМ, разведение 1:6) тестировали в присутствии константных концентраций PDGF. Антитела предварительно инкубировали с белками PDGF в течение 30 минут перед добавлением к клеткам с помощью системы FLIPR. Малые молекулы сералутиниб и иматиниб предварительно инкубировали в течение 30 минут с клетками в среде для анализа и красителем из набора Calcium в диапазоне концентраций от 10000 нМ до 8 нМ (серийное разведение 1:6). Эти следы кальция анализировали в отношении их макс.-мин. значений с использованием программного обеспечения SoftMax Pro (Molecular Devices).

[0326] Пролиферацию оценивали с помощью системы визуализации живых клеток IncuCyte (Essen BioScience). После высевания на ночь, полную среду замещали бессывороточной средой для культивирования гладкомышечных клеток, дополненной 0,1% BSA. Антитела предварительно инкубировали с константными концентрациями PDGF в течение 30 минут, тогда как клетки предварительно обрабатывали низкомолекулярными соединениями иматинибом и сералутинибом перед добавлением PDGF. Планшеты визуализировали каждые 3 часа на протяжении 7 суток, и пролиферацию определяли путем измерения конфлюентности клеток в лунке на 6-е сутки с помощью базового программного обеспечения для анализа IncuCyte (Sartorius).

#### Результаты

[0327] Семейство факторов роста PDGF представляет собой набор сильных митогенов, которые представляют интерес в контексте легочной артериальной гипертензии. Различные терапевтические средства, включая низкомолекулярные киназные ингибиторы рецепторов под названием сералутиниб и иматиниб, нацелены на сигнальный путь с участием PDGF/PDGFR. В данном исследовании связывающую PDGF-BB молекулу H4H13145P напрямую сравнивали с такими низкомолекулярными ингибиторами PDGFR в двух *in vitro* клеточных анализах.

[0328] Как сералутиниб, так и иматиниб полностью ингибировали обусловленный PDGF-AA, PDGF-DD и PDGF-BB поток кальция и пролиферацию. PDGF-AA передает сигнал через PDGFR $\alpha$ , PDGF-DD передает сигнал через PDGFR $\beta$  и PDGF-BB передает сигнал через оба димерных рецептора. Как показано в **таблице 22**, сералутиниб является более сильным по сравнению с иматинибом в данном клеточном анализе, со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне 6-27 нМ. Иматиниб был способен полностью ингибировать передачу сигналов с участием PDGF со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне 110-650 нМ. H4H13145P был способен полностью ингибировать обусловленный PDGF-BB поток кальция и пролиферацию с IC<sub>50</sub> 0,11 нМ и 0,14 нМ соответственно. H4H13145P является более сильным в отношении PDGF-BB, по сравнению с низкомолекулярными ингибиторами PDGFR, сералутинибом и иматинибом (**таблица 22 и фигуры 27-28**).

**Таблица 22.** Обобщенные значения IC<sub>50</sub> в *in vitro* анализах.

IC <sub>50</sub>	Сералутиниб			Иматиниб			H4H13145P
	PDGF-AA	PDGF-DD	PDGF-BB	PDGF-AA	PDGF-DD	PDGF-BB	
<b>Белок</b>	PDGF-AA	PDGF-DD	PDGF-BB	PDGF-AA	PDGF-DD	PDGF-BB	PDGF-BB
<b>Поток кальция</b>	10 нМ	27 нМ	10 нМ	270 нМ	660 нМ	330 нМ	0,110 нМ
<b>Пролиферация</b>	9 нМ	6 нМ	6 нМ	110 нМ	320 нМ	410 нМ	0,140 нМ

**Пример 18. Тестирование опосредованной рецептором интернализации антитела в первичных гладкомышечных клетках легочной артерии человека и первичных фибробластах легких человека.**

#### Реагенты

[0329] Реагенты, используемые для тестирования опосредованной рецептором интернализации антитела в первичных гладкомышечных клетках легочной артерии человека и первичных фибробластах легких человека, включают следующее: гладкомышечные клетки легочной артерии человека (PASMC), Lonza, № по каталогу CC-2581, № партии 0000559495; нормальные фибробласты легких человека (NHLF), Lonza, № по каталогу CC-2512, № партии 0000494609; среда DMEM, Thermofisher, № по каталогу 11965092; раствор бычьего сывороточного альбумина, Millipore-Sigma, № по каталогу A9576; среда для культивирования гладкомышечных клеток, Lonza, CC-3182; набор для

мечения антител красным красителем pHrodo™Deep, № по каталогу P35355 Thermo Fisher; набор для мечения пролиферирующих клеток фиолетовым красителем CellTrkr™, № по каталогу C34571 Thermo Fisher; PDGF-BB - R&D Systems, № по каталогу 220-GMP; PDGF-AB - R&D Systems, № по каталогу 222-AB; набор для анализа Calcium 5, Molecular Devices, № по каталогу R8185; пробенецид, Thermofisher, № по каталогу P36400; PDGFR $\alpha$ -APC, Abcam, № по каталогу AB119838; PDGFR $\beta$ -APC, R&D Systems, № по каталогу FAB1263A; изотипическое антитело-APC, Abcam, № по каталогу AB37391; витальный краситель DAPI, Thermofisher, № по каталогу 62248; и фермент GypLE™ Express, Thermofisher, № по каталогу 12604013.

#### Процедуры экспериментов

[0330] Мечение антитела: мечение антитела с помощью pHrodo Deep Red выполняли в соответствии с руководством пользователя, предоставленным в наборе для мечения антител Invitrogen pHrodo™Deep Red (номера в каталоге P35355 и P35356). Анализы интернализации антитела осуществляли с использованием следующих процедур:

[0331] **Анализ интернализации антитела 1:** (1) высевание 20000 PASMС на лунку в 96-луночный планшет и инкубация клеток в полной среде в течение ночи при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>; (2) удаление полной культуральной среды, промывка один раз PBS, затем мечение клеток фиолетовым красителем CellTrkr в течение 15 минут; (3) удаление раствора CellTrkr; (4) предварительное связывание меченых (pHrodo) mAb к PDGF-B с PDGF-BB или PDGF-AB в течение 30 минут при комнатной температуре перед обработкой клеток; (5) добавление растворов антитело-лиганд к клеткам. отсутствие предварительного связывания в качестве контроля; (6) визуализацию живых клеток проводили каждый час в системе визуализации Opera Phenix на протяжении вплоть до 21 часа; и (7) анализ данных с помощью программного обеспечения Harmony 4.9.

[0332] **Анализ интернализации антитела 2 (с блокированием рецепторов):** (1) высевание 20000 PASMС на лунку в 96-луночный планшет и инкубация клеток в полной среде в течение ночи при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>; (2) удаление полной культуральной среды, промывка один раз PBS, затем мечение клеток фиолетовым красителем CellTrkr в течение 15 минут; (3) удаление раствора CellTrkr; (4) добавление антитела к PDGFR $\alpha$  (REGN1574), антитела к PDGFR $\beta$  (REGN764) при 500 нМ каждого, или в комбинации, к клеткам на 30 минут; (5) предварительное связывание каждого из меченых (pHrodo) mAb к PDGF-B с PDGF-BB или PDGF-AB в течение 30 минут при комнатной температуре перед обработкой клеток; (6) добавление растворов антитело-лиганд к клеткам; (7) визуализацию живых клеток проводили каждый час в системе визуализации Opera Phenix на протяжении вплоть до 72 часов; и (8) анализ данных с помощью программного обеспечения Harmony 4.9.

[0333] **Анализ интернализации антитела с помощью FLIPR (планшет-ридер для флуорометрической визуализации):** (1) высевание 10000 PASMС на лунку в 96-луночный планшет и инкубация клеток в полной среде в течение ночи при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>; (2) предварительная инкубация смеси антител к PDGF-BB при соотношении 10-1 нМ в течение 10 минут в среде для анализа (DMEM-0,1% BSA-1x пенициллин/стрептомицин/L-

глутамин); (3) замещение полной среды раствором REGN1945 и H4H13145P к PDGF-BB при соотношении 10-1 нМ; (4) обработка клеток смесью антитело-лиганд в течение 3, 24 и 48 часов; (5) промывка монослоя клеток 3x PBS; (6) добавление 50 мкл среды для анализа и 50 мкл красителя из Calcium 5; (7) инкубация планшета в течение 1 часа после добавления красителя перед считыванием планшетов с помощью устройства для визуализации FLIPR Tetra; (8) помещение собранного и обработанного планшета в систему FLIPR для обработки клеток серийным разведением PDGF-BB (25-0,04 нМ, разведение 1:6); и (9) анализ следов кальция в отношении их макс.-мин. значений с использованием программного обеспечения SoftMax Pro (Molecular Devices)

[0334] **Анализ интернализации антитела с помощью проточной цитометрии:** (1) высевание 300000 PASC на лунку в 6-луночный планшет и инкубация клеток в полной среде в течение ночи при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>; (2) предварительная инкубация смеси антител к PDGF-BB в соотношении 10-1 нМ в течение 10 минут в среде для анализа (DMEM-0,1% BSA-1x пенициллин/стрептомицин/L-глутамин); (3) замещение полной среды антителами к PDGF-BB при соотношении 10-1 нМ; (4) обработка клеток смесью антитело-лиганд в течение 24 часов; (5) промывка монослоя клеток 3x PBS; (6) снятие клеток с поверхности 6-луночного планшета с использованием фермента TrypLE™ Express; (7) центрифугирование и ресуспендирование в буфере для окрашивания клеток (10% DMEM, 5% FBS); (8) окрашивание клеток на льду APC-конъюгированными антителами к PDGFRa и PDGFRb в течение 1 часа в соответствии с протоколом от производителя; (9) центрифугирование и промывка клеток 3x; (10) перед помещением в проточный цитометр CytoFlex, добавление к клеткам витального красителя DAPI в конечной концентрации 1 мкг/мл; (11) запись данных для 10000 клеток на проточном цитометре CytoFlex с гейтированием в отношении отдельных живых клеток; и (12) анализ данных проточного цитометра с помощью программного обеспечения FlowJo (BD Biosciences).

### Результаты

[0335] В ходе нескольких отдельных анализов было показано, что H4H13145P может интернализироваться в различные линии клеток лиганд-зависимым образом через рецепторы PDGF.

[0336] **Интернализация антитела:** Мечение антител к PDGF-B pHrodo Deep Red обеспечивало возможность оценки интернализации антитела в анализе с первичными PASC человека. pHrodo Deep Red излучает свет при уровнях pH, встречающихся в поздних эндосомах или лизосомах. При нормальном уровне pH свет не излучается. Это позволяет оценить интернализацию, зависящую от времени, используя конфокальную визуализацию. Как показано в **таблицах 23-24**, совместная обработка меченных H4H13145P-PDGFBB приводила к 108-127-кратному изменению флуоресцентного сигнала по сравнению с меченым изотипическим контролем REGN1945 как в PASC, так и в NHLF. Аналогичная тенденция наблюдается при более низкой величине для PDGF-AB. Это увеличение флуоресцентного сигнала, который испускается только после того, как меченые антитела интернализуются в клетку, уменьшается, когда клетки предварительно

обрабатывают двумя антителами, которые ингибируют как рецептор PDGFR $\alpha$ , так и рецептор PDGFR $\beta$ . Эти данные свидетельствуют о том, что H4H13145P интернализуется в клетку лиганд-зависимым образом через рецепторы PDGF.

[0337] **FLIPR-данные:** В этом анализе PDGF-BB связывается с рецепторами PDGF и вызывает быструю интернализацию рецепторов и десенсибилизацию клеток к последующим обработкам PDGF-BB. Как показано в **таблице 25** и на **фигуре 29**, PASMС предварительно обработанные REGN1945-PDGFBB (10:1 нМ), были десенсибилизированы к последующему индуцированному PDGF-BB потоку кальция. H4H13145P был способен нейтрализовать PDGF-BB и ограничивать наблюдаемую потерю чувствительности к PDGF-BB. По сравнению со средой в качестве контроля, в группе H4H13145P не наблюдали способность полностью предотвращать десенсибилизацию к PDGF-BB. Обработка H4H13145P-PDGFBB характеризовалась небольшим сдвигом вправо в эффективности и небольшим снижением ответа в виде макс.-мин. потока кальция при обработке 5 нМ PDGF-BB. Это может быть объяснено тем, что комплексы антитело-лиганд связываются с рецептором PDGFR и вызывают интернализацию рецептора, хотя со скоростью и величиной, значимо меньшими, чем в случае несвязанного PDGF-BB.

[0338] **Проточная цитометрия** PASMС экспрессируют как PDGFR $\alpha$ , так и PDGFR $\beta$ . В группе обработки REGN1945-лиганд не было выявлено флуоресцентного сигнала как для PDGFR $\alpha$ , так и для PDGFR $\beta$ . Это наблюдение подтверждает быструю лиганд-зависимую интернализацию рецепторов в ответ на PDGF-BB. H4H13145P предотвращало наблюдаемую потерю флуоресцентного сигнала PDGFR $\beta$ . Наблюдался небольшой сдвиг и потеря экспрессии PDGFR на клеточной поверхности в группе обработки H4H13145P, по сравнению со средой в качестве контроля, что указывало на интернализацию рецептора, хотя и с меньшей скоростью и величиной по сравнению с несвязанным PDGF-BB.

**Таблица 23.** Интернализация в PASMС в случае флуоресцентного мечения антитела.

PASMС	Предварительно е блокирование Ab	Предварительное связывание антитела с PDGF-AB		Предварительное связывание антитела с PDGF-BB	
		Интенсивность А647	Кратность изменения *	Интенсивность А647	Кратность изменения *
H4H1314 5P	среда	2,3E+07	48,53	5,3E+07	108,71
	Антитело к PDGFR $\alpha$	1,3E+07	27,40	5,3E+07	108,92
	Антитело к PDGFR $\beta$	1,3E+07	28,47	4,2E+07	85,93
	Антитело к	652814	1,41	2842206	5,89



EC50	48 пМ	85 пМ	79 пМ	93 пМ	230 пМ	400 пМ	600 пМ	---	---
<b>Макс.-мин.</b>									
<b>при 5 нМ</b>	8132 ±	9066 ±	8345 ±	7408 ±	7410 ±	6822 ±	3948 ±	1458 ±	492 ±
<b>PDGF-BB</b>	1670	804	66	282	628	1501	293	192	324
<b>(RFU)</b>									

**Пример 19. Оценка эффекта двух ингибирующих антител к PDGF-B в крысиной модели индуцированной монокроталином легочной артериальной гипертензии.**

#### Реагенты

[0339] Реагенты, используемые для оценки эффекта двух ингибирующих антител к PDGF-B в крысиной модели индуцированной монокроталином легочной артериальной гипертензии, включали следующее: **монокроталин** (кроталин) Sigma № по каталогу PHL89251 - номер CAS: 315-22-0, MDL: MFCD00084656, формула: C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub>, масса по формуле: 325,36 г/моль, температура хранения: 2-8 °С, чистота: 98%; **мацитентан** MedChemExpress, № по каталогу HY-14184 - пероральный активный антагонист рецепторов эндотелина, номер CAS: 441798-33-0, формула: C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S, масса по формуле: 588,27 г/моль, № партии: 10673, температура хранения: -20°С в течение 3 лет, чистота: 98%; и **PEG-400** (при 50:50 об./об., Affymetrix Inc., #19957).

#### Процедура эксперимента

[0340] Для оценки эффекта двух ингибирующих антител к PDGF-B в крысиной модели индуцированной монокроталином легочной артериальной гипертензии осуществляли 2 исследования: исследование № 1 осуществляли на крысах с РАН, которым 4 недели вводили монокроталин, с превентивной обработкой лекарственным средством; и исследование № 2 осуществляли на крысах с тяжелой РАН, которым 5 недель вводили монокроталин, с терапевтической обработкой лекарственным средством (**таблицы 26-27**).

[0341] Использовали шести-семи-недельных самцов крыс Спрег-Доули. Крыс разделяли на группы обработки таким образом, чтобы исходная масса тела была одинаковой в разных группах. В исследовании № 1, за сутки до инъекции монокроталина, крысам в группах обработки антителом подкожно вводили либо антитела к PDGF-B, либо IgG в качестве изотипического контроля, при 10 мг/кг, при этом введение дозы продолжали в режиме 2 раза в неделю в течение 28 суток. На первые сутки крысам подкожно вводили либо 40 мг/кг монокроталина, либо 5 мл/кг солевого раствора в качестве контроля. На 28-е сутки измеряли систолическое давление в правом желудочке (RVSP) с помощью катетеризации правых отделов сердца, и RV-гипертрофию рассчитывали по индексу Фултона как соотношение масс RV и (LV+сердечная перегородка). В исследовании № 2, крысам подкожно вводили либо 60 мг/кг монокроталина, либо 5 мл/кг солевого раствора. Начиная с 14-х суток, крысам в группах обработки антителом подкожно вводили либо антитело к PDGF-B, либо IgG в качестве изотипического контроля при 25 мг/кг, 2 раза в неделю. Группе, получающей малые молекулы, перорально вводили мацитентан при 30

мг/кг в сутки. Изменение массы тела с 0-х по 35-е сутки использовали для оценки общей токсичности, и к 35-м суткам рассчитывали смертность животных и медианное время выживания.

**Таблица 26.** Исследование № 1 - Крысы с РАН, которым 4 недели вводили монокроталин, с использованием превентивной обработки лекарственным средством.

Группа	Условия	Обработка	Монокроталин	REGN#	Дозировка	Частота	Путь	День начала	Число крыс/группа
1	Солевой раствор	Солевой раствор	N/A	N/A	5 мл/кг	Один раз на 1-е сутки	SC	N/A	8
2	Монокроталин (40 мг/кг) + IgG в качестве изотипического контроля	IgG-антитело в качестве изотипического контроля	40 мг/кг s.c. один раз на 1-е сутки	REG N1945	10 мг/кг	Два раза в неделю	SC	-1	12
3	Монокроталин (40 мг/кг) + антитело к PDGF-B 1	Антитело к PDGF-B 1	40 мг/кг s.c. один раз на 1-е сутки	H4H1 3145P	10 мг/кг	Два раза в неделю	SC	-1	12
4	Монокроталин (40 мг/кг) + антитело к PDGF-B 2	Антитело к PDGF-B 2	40 мг/кг s.c. один раз на 1-е сутки	H4H1 3132P	10 мг/кг	Два раза в неделю	SC	-1	12

**Таблица 27.** Исследование № 2 - Выживание крыс с тяжелой РАН, которым 5 недель вводили монокроталин, при терапевтической обработке лекарственным средством.

Группа	Условия	Обработка	Монокроталин	REGN#	Дозировка	Частота	Путь	День начала	Число крыс/ группа
1	Солевой раствор	Солевой раствор	N/A	N/A	5 мл/кг	Один раз на 1-е сутки	SC	N/A	8
2	Монокроталин (60 мг/кг) + IgG в качестве изотипического контроля	IgG-антитело в качестве изотипического контроля	60 мг/кг s.c. один раз на 1-е сутки	REGN 1945	10 мг/кг	Два раза в неделю	SC	14	16
3	Монокроталин (40 мг/кг) + антитело к PDGF-B	Антитело к PDGF-B	60 мг/кг s.c. один раз на 1-е сутки	REGN 13335	10 мг/кг	Два раза в неделю	SC	14	12
4	Монокроталин (40 мг/кг) + мацитентан	Антагонист рецепторов эндотелина мацитентан	60 мг/кг s.c. один раз на 1-е сутки	N/A	30 мг/кг	Ежесуточно	через желудочный зонд	14	11
5	Монокроталин (40 мг/кг)	Антитело к PDGF-B+мацитентан	60 мг/кг s.c.	REGN 13335	Мацитентан 30	Мас: ежесуточно	Мас: через желудоч		12

	+мацитента н +антитело к PDGF-B	нтан	один раз на 1-е сутки		мг/кг REG N 13335 10 мг/кг	REGN 13335, два раза в неделю	ный зонд H4H131 45P: SC		
--	--	------	--------------------------------	--	---	---	----------------------------------	--	--

[0342] **Катетеризация правых отделов сердца и систолическое давление в правом желудочке:** Крыс анестезировали изофлураном и удерживали при примерно 37°C с использованием нагреваемой платформы (Heated Hard Pad 1, Braintree Scientific) и циркуляционного водяного насоса с подогревом (T/Pump Classic, Gaymar Industries). Область шеи каждой крысы готовили к хирургическому вмешательству путем депиляции над правой общей сонной артерией и правой яремной веной. Делали разрез и осторожно изолировали правую яремную вену, чтобы не повредить сонную артерию и/или блуждающий нерв. Кусок шелковой хирургической нити 5-0 помещали под изолированную яремную вену, чтобы обеспечить возможность ретракции сосуда краниально, затем с помощью иглы 23 калибра делали отверстие в яремной вене. Катетер для измерения давления (датчик давления для катетера Micro-tip SPR-1000, Millar Instruments, Inc.) вставляли в отверстие яремной вены и продвигали через правое предсердие в правый желудочек. Катетер присоединяли к прибору для измерения давления/объема (MPVS-300, Millar Instruments, Inc.), который позволяет измерять частоту сердечных сокращений, а также как диастолическое, так и систолическое давление в правом желудочке. Эти параметры были получены в цифровом виде с использованием системы сбора данных (PowerLab 4/35, AD Instruments). Программное обеспечение LabChart Pro 7.0 (AD Instruments) использовали для анализа показателей давления в правом желудочке. Показания были количественно оценены для 60-секундного интервала отслеживания давления (после 2-минутного периода записи, чтобы обеспечить стабилизацию давления). Анализируемыми параметрами были показатели систолического давления в правом желудочке (RVSP) и частота сердечных сокращений (HR).

[0343] **Оценка гипертрофии правых отделов сердца:** После гемодинамических измерений *in vivo*, животных умерщвляли с помощью процедур обескровливания под наркозом, а затем собирали и взвешивали ткань свободной стенки RV, левого желудочка (LV) и сердечной перегородки. Гипертрофию RV рассчитывали по индексу Фултона как соотношение масс RV и (LV+сердечная перегородка).

#### Результаты

[0344] **Повышение давления в правом желудочке, индуцированное у крыс, которым вводили монокроталин:** В исследовании № 1, у крыс, которым вводили монокроталин, с помощью оценки с использованием катетера показателей давления в правом желудочке сердца было выявлено значимое повышение показателей систолического давления в правом желудочке в группе, обработанной изотипическим



				e (RVSP)			RV)
		мг/кг		Среднее ± SD	%	Среднее ± SD	%
Солевой раствор	N/A	N/A	8	26,38± 2,77	N/A	0,2861±0,0292	N/A
МСТ+IgG в качестве изот. контроля	REGN 1945	10	12	71,15± 8,82*	N/A	0,6871±0,0910 *	N/A
МСТ+антитело к PDGF-B ab1	H4H13 145P	10	11	54,36± 12,87*##	38%	0,5431±0,1313 *#	36%
МСТ+антитело к PDGF-B ab2	H4H13 132P	10	11	55,26± 11,56*##	35%	0,5644±0,1347 *#	30%

\* p< 0,00001 в сравнении с солевым раствором в качестве контроля, ## p<0,01 в сравнении с МСТ+IgG в качестве изот. контроля, # p<0,05 в сравнении с МСТ+IgG в качестве изот. контроля

**Таблица 29**

Группа	№ крыс	№ смертей к 35-м суткам	Доля выживших животных к 35-м суткам	Медианное выживание (сутки)
Солевой раствор	8	0	1	N/A
МСТ-REGN1945	16	15	6%*	22,5
МСТ-H4H13145P	12	6	50%*#	34
МСТ+мацитентан	11	11	0%*	20
МСТ+H4H13145P+мацитентан	11	7	36%*Δ	26

\* $p < 0,00001$  в сравнении с соевым раствором в качестве контроля, #  $p < 0,05$  в сравнении с МСТ+IgG в качестве изот. контроля,  $\Delta p < 0,01$  в сравнении с МСТ+мацитентан

### **ЭКВИВАЛЕНТЫ**

[0348] Специалистам в данной области техники будет понятно, или они смогут установить, используя не более чем стандартные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов реализации и способов, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены объемом нижеследующей формулы изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ПРОИЗВОЛЬНОЙ ФОРМЕ

#### **H4H13145P**

SEQ ID NO: 1; HCVR

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTAAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCTGGTTATACTTATGGTGCCTATGCAATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTACACAAACTATGCACAGAAATTCCAGGACAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAACACAGCCTACATGGAAGTGAAGGGCCTAAAATCTGACGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGGGCCTGGAAGTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 2; HCVR

QVQLVQSGTEVKKPGASVKVSKASGYTYGAYAISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKFQDRVTMTTDTSTNTAYMELRGLKSDDTAVYFCARAWNSFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 3; HCDR1

GGT TAT ACT TAT GGT GCC TAT GCA

SEQ ID NO: 4; HCDR1

G Y T Y G A Y A

SEQ ID NO: 5; HCDR2

ATC AGC GCT TAC AAT GGT AAC ACA

SEQ ID NO: 6; HCDR2

I S A Y N G N T

SEQ ID NO: 7; HCDR3

GCG AGG GCC TGG AAC TCC TTT GAC TAC

SEQ ID NO: 8; HCDR3

A R A W N S F D Y

SEQ ID NO: 9; LCVR

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCGTCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGGAAAAATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTCCGATGCATCCACTTTAGAAACAGGGTCCCATCAAGATTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCA

GCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAAAATATTACTGTCAACAATATTATAATCTCC  
CATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA

SEQ ID NO: 10; LCVR

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCQASQDIRKNLNWYQQKPGKAPKLLISDASTLETGVPS  
RFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIAKYYCQQYYNLPFTFGPGTKVDIK

SEQ ID NO: 11; LCDR1

CAG GAC ATT AGG AAA AAT

SEQ ID NO: 12; LCDR1

Q D I R K N

SEQ ID NO: 13; LCDR2

GAT GCA TCC

SEQ ID NO: 14; LCDR2

D A S

SEQ ID NO: 15; LCDR3

CAA CAA TAT TAT AAT CTC CCA TTC ACT

SEQ ID NO: 16; LCDR3

Q Q Y Y N L P F T

SEQ ID NO: 17; HC

CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTAAA  
GGTCTCCTGCAAGGCCTCTGGTTATACTTATGGTGCCTATGCAATCAGCTGGGTGCG  
ACAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTA  
ACACAACTATGCACAGAAATTCCAGGACAGAGTCACCATGACCACAGACACATCC  
ACGAACACAGCCTACATGGAAGTGAAGGGCCTAAAATCTGACGACACGGCCGTGTA  
TTTCTGTGCGAGGGCCTGGAAGTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAC  
TGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAG  
GAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG  
AACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC  
CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC  
TCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAA  
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCC  
CAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAACCCAAGG  
AACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC  
AGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAAT  
GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT  
CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT  
CCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAG  
CCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAA  
CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGA  
GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG  
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC

AGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA  
CACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 18; HC

QVQLVQSGTEVKKPGASVKVSKASGYTYGAYAISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG  
NTNYAQKFQDRVTMTTDTSTNTAYMELRGLKSDDTAVYFCARAWNSFDYWGQGLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAV  
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD  
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK\*

SEQ ID NO: 19; LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCGTCTGTAGGAGACAGAGTC  
ACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGGAAAAATTTAAATTGGTATCAACA  
GAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTCCGATGCATCCACTTTAGAAACAG  
GGTCCCATCAAGATTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCA  
GCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAAAATATTACTGTCAACAATATTATAATCTCC  
CATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCAT  
CTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT  
GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA  
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC  
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA  
CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA  
GCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 20; LC

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQDIRKNLNWYQQKPGKAPKLLISDASTLETGVPS  
RFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIAKYYCQQYNNLPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSD  
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL  
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\*

#### **H4H13132P**

SEQ ID NO: 21; HCVR

CAGGTGCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAA  
GGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCG  
ACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTA  
CAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCACGGACGAATCC  
ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTATA  
TACTGTGCGAGAGAGGGCTACGGTGACTACTTTCGGTATGGACGTCTGGGGCCA  
AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 22; HCVR

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTAN

YAQKFQGRVTITTTDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGYGDYYFGMDVWGQGT  
 VTVSS

SEQ ID NO: 23; HCDR1

GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GCT

SEQ ID NO: 24; HCDR1

G G T F S S Y A

SEQ ID NO: 25; HCDR2

ATC ATC CCT ATC TTT GGT ACA GCA

SEQ ID NO: 26; HCDR2

I I P I F G T A

SEQ ID NO: 27; HCDR3

GCG AGA GAG GGC TAC GGT GAC TAC TAC TTC GGT ATG GAC GTC

SEQ ID NO: 28; HCDR3

A R E G Y G D Y Y F G M D V

SEQ ID NO: 29; LCVR

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCC  
 TCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATACAGTGATGGAAACACCTACTTG  
 AATTGGTTTCAGCAGAGGCCAGACCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGATTTCT  
 AACCGGGACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTT  
 CACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC  
 AAGGTACACACTGGCCTCCCACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

SEQ ID NO: 30; LCVR

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQRPDQSPRRLIYKISNRD  
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCMQGTHWPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 31; LCDR1

CAA AGC CTC GTA TAC AGT GAT GGA AAC ACC TAC

SEQ ID NO: 32; LCDR1

Q S L V Y S D G N T Y

SEQ ID NO: 33; LCDR2

AAG ATT TCT

SEQ ID NO: 34; LCDR2

K I S

SEQ ID NO: 35; LCDR3

ATG CAA GGT ACA CAC TGG CCT CCC ACT

SEQ ID NO: 36; LCDR3

M Q G T H W P P T

SEQ ID NO: 37; HC

CAGGTGCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAA  
 GGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCG  
 ACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTA

CAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCACGGACGAATCC  
 ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTATA  
 TTACTGTGCGAGAGAGGGCTACGGTGACTACTACTTCGGTATGGACGTCTGGGGCCA  
 AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT  
 GGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA  
 AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGGCGCCCTGACCAGC  
 GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
 GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGA  
 TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCC  
 CATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTC  
 CCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGG  
 TGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGC  
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGT  
 ACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAG  
 TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCC  
 AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGA  
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCA  
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC  
 CACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTCACCGT  
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG  
 CTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 38; HC

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTAN  
 YAQKFQGRVTITTTDESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGYGDYYFGMDVWGQTT  
 VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL  
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV  
 DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK\*

SEQ ID NO: 39; LC

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCC  
 TCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATACAGTGATGGAAACACCTACTTG  
 AATTGGTTTCAGCAGAGGCCAGACCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGATTTCT  
 AACCGGGACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTGAGGCACTGATTT  
 CACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC  
 AAGGTACACACTGGCCTCCCACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGA  
 ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG  
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC  
 AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG

CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGC  
AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT  
CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 40; LC

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPDQSPRRLIYKISNRD  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPPTFGQGTKLEIKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY  
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\*

**hPDGF-B**

SEQ ID NO: 41; P01127|PDGFB\_субъединица В тромбоцитарного фактора роста  
ЧЕЛОВЕКА OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDGFB PE=1 SV=1

MNRCWALFLSLCCYLRLVSAEGDPIPEELYEMLSDHSIRSFDDLQRL LHGDPGEEDGAE  
LDLNMTRSHSGGELESLARGRRSLGSLTIAEPAMIAECKTRTEVFEISRRLIDRTNANFLV  
WPPCVEVQRCSGCCNNRNQVCRPTQVQLRPVQVRKIEIVRKKPIFKKATVTLEDHLACK  
CETVAAARPVTRSPGGSQEQRAKTPQTRVTIRTIVRVRPPKGGKHRKFKHHTHDKTALKET  
LGA

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с субъединицей В тромбоцитарного фактора роста (PDGF-B) человека, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент проявляют одно или несколько свойств, выбранных из группы, состоящей из следующего:

(а) связываются с гомодимером субъединицы В PDGF человека (PDGF-BB) при 37°C с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) менее чем около 1,84 пМ, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса;

(b) связываются с PDGF-BB человека при 37°C с  $K_D$  менее чем около 1,36 пМ, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса;

(c) связываются с PDGF-BB человека при 37°C с  $t^{1/2}$ , превышающим или равным около 1155 минутам, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса;

(d) связываются с PDGF-BB человека при 25°C с  $K_D$  менее чем около 2,79 пМ, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса;

(e) связываются с PDGF-BB человека при 25°C с  $t^{1/2}$ , превышающим или равным около 1155 минутам, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса;

(f) ингибируют активацию PDGF-B в отношении PDGF-BB человека с  $IC_{50}$  менее чем около 1,9 нМ, как измерено в конкурентном ELISA-анализе при 25 °C;

(g) ингибируют активацию PDGF-B в отношении гетеродимера субъединицы А и субъединицы В PDGF (PDGF-AB) человека с  $IC_{50}$  менее чем около 8,8 нМ, как измерено в конкурентном ELISA-анализе при 25 °C; и

(h) блокируют взаимодействие между PDGF-BB человека и одним или несколькими из PDGFR- $\alpha\alpha$ , PDGFR- $\alpha\beta$  и PDGFR- $\beta\beta$  человека.

2. Выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PDGF-B человека, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей варибельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

3. Выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-2, которые содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:22.

4. Выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, которые содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ

ID NO:10 или SEQ ID NO:30.

5. Выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, которые содержат: (a) HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 22; и (b) LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 30.

6. Выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, которые содержат:

(a) HCDR1-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 24;

(b) HCDR2-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 26;

(c) HCDR3-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 28;

(d) LCDR1-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 32;

(e) LCDR2-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 34; и/или

(f) LCDR3-домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 36.

7. Выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 и 22/30.

8. Выделенное антитело человека или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, которые содержат:

(i) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18; и/или

(ii) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40, и

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38.

9. Антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, который представляет собой Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, молекулу одноцепочечного Fv (scFv) или dAb-фрагмент.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают тот же эпитоп на PDGF-B человека, что и антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые

конкурируют за связывание с PDGF-B человека с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-9.

12. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-11, включающий:

(i) введение одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих легкую иммуноглобулиновую цепь указанных антитела или фрагмента и тяжелую иммуноглобулиновую цепь указанных антитела или фрагмента, в клетку-хозяина;

(ii) культивирование клетки-хозяина в питательной среде в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида(полинуклеотидов); и

(iii) необязательно выделение антитела или фрагмента из клетки-хозяина и/или среды, в которой растет клетка-хозяин.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые получены способом по п.12.

14. Устройство для инъекций или сосуд, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-11 и 13.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PDGF-B человека, по любому из пп. 1-11 и 13, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель; и, необязательно, одно или несколько дополнительных терапевтических средств.

16. Фармацевтическая композиция по п. 15, где одно или несколько дополнительных терапевтических средств включают пищевую добавку, содержащую железо.

17. Способ профилактики или лечения легочной артериальной гипертензии (РАН) у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-11 и 13; или фармацевтической композиции по любому из пп. 15-16.

18. Способ по п. 17, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно, внутривенно, внутридермально, перорально или внутримышечно.

19. Способ по любому из пп. 17-18, где РАН влечет за собой состояние, выбранное из группы, состоящей из утолщения легочной артерии у пациента; уменьшения ударного объема у пациента; уменьшения сердечного выброса для правого желудочка у пациента; и уменьшения времени выживания пациента; и

введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента обеспечивает лечение состояния или снижение тяжести одного или нескольких симптомов состояния.

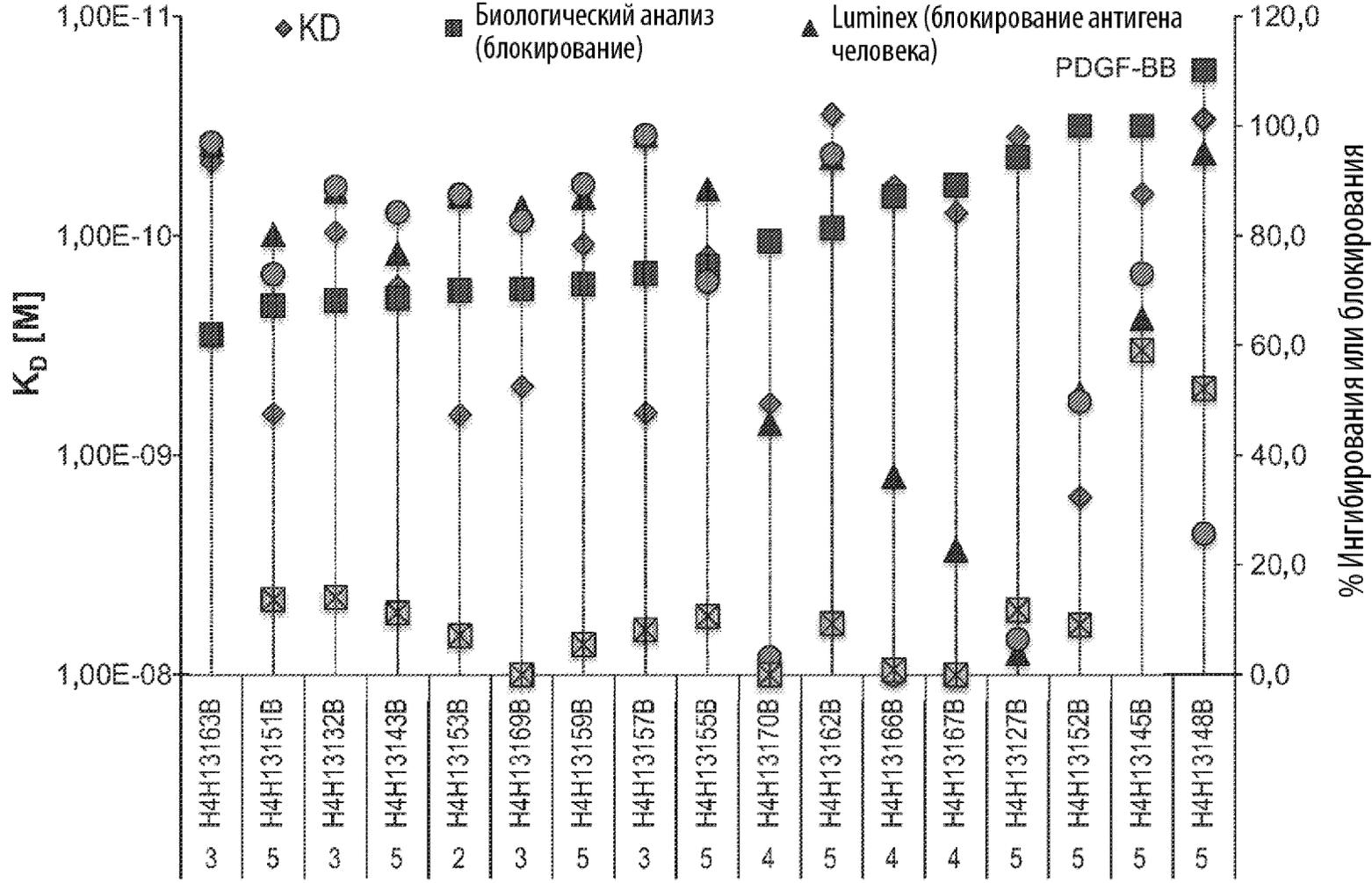
20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-11 и 13 для лечения пациента с РАН.

21. Композиция, содержащая одно или несколько антител или их антигенсвязывающих фрагментов по любому из пп. 1-11 и 13 для лечения РАН.

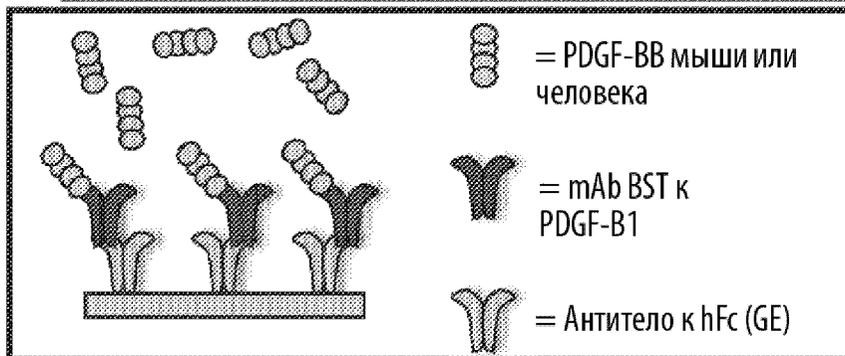
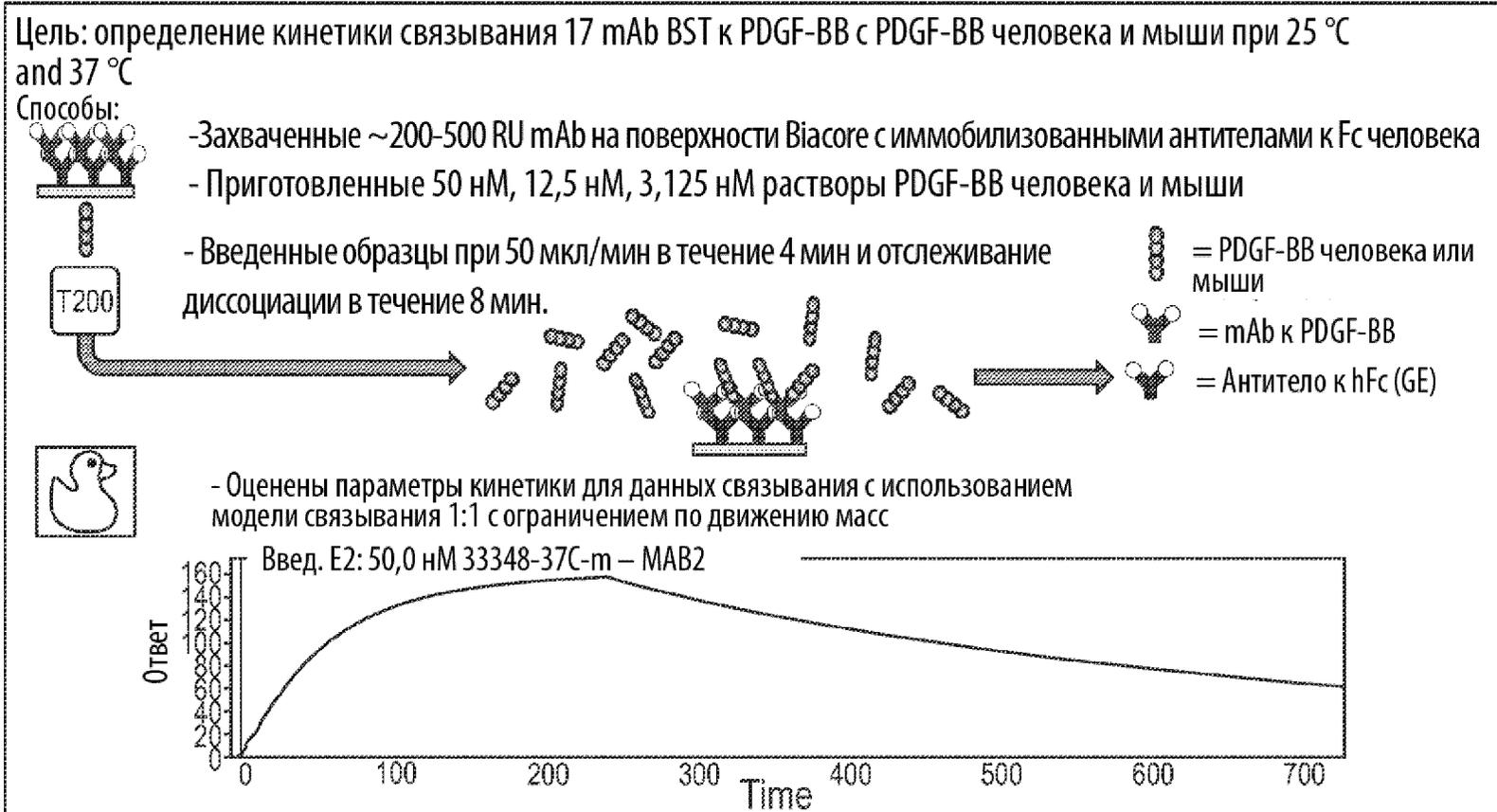
22. Применение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-11 и 13 в производстве лекарственного препарата для лечения пациента с РАН.

По доверенности

Фиг. 1

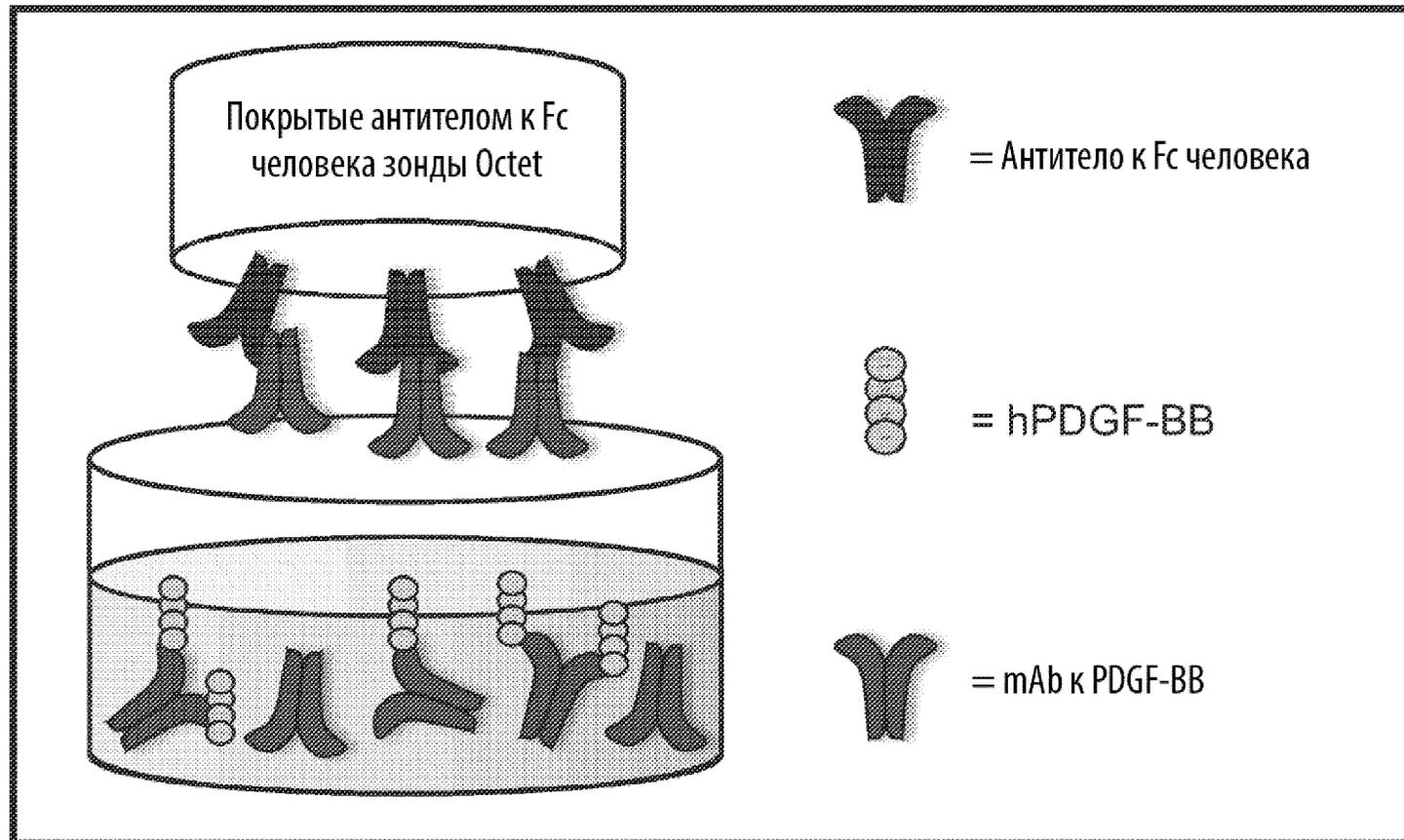


Фиг. 2



**Используемый прибор:** Biacore T200-2 (красный)  
**Темп.:** 25 °C и 37 °C  
**Подвижный буфер:** HBS-T + 300 мМ NaCl pH 7,4  
**Тип чипа:** CM5: антитело к hFc (GE)  
**Поверхность проточной ячейки:** Fc2, Fc3, Fc4  
**Скорость потока для захвата/время:** 10 мкл/мин, 30 сек  
**Скорость потока при введении образца/время:** 50 мкл/мин, 3 мин  
**Раствор для регенерации:** 15-сек импульсная подача Gly, уровень pH 1,5

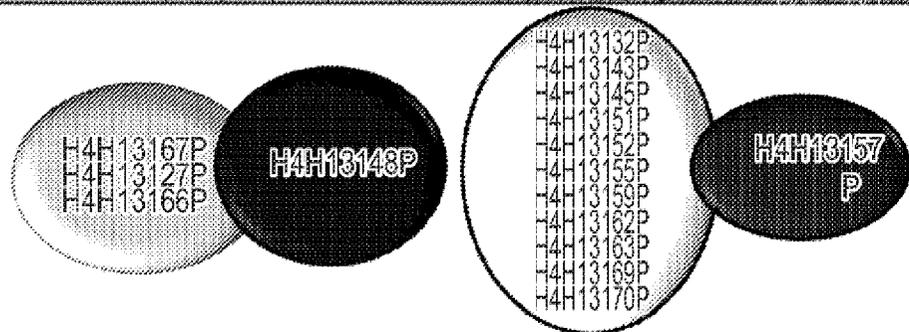
Фиг. 3А



Фиг. 3В

Вычитание фонового сигнала вследствие самосвязывания			Связывание mAb-1 с предварительно образованным комплексом mAb-2 и hPDGF-BB (R&D)																		
Антитело к PDGF-BB (AbID)	Захватываемое mAb (нМ)	Блокирующее mAb к Fc человека (нМ)	№ mAb	15	1	14	5	2	3	4	6	7	9	11	12	13	16	17	10	8	18
H4H13167P	1,6	0,01	15	0,0	0,0	0,0	1,2	1,0	0,8	1,1	0,9	0,8	1,1	0,8	0,9	0,9	1,0	0,8	1,0	0,6	0,5
H4H13127P	1,5	0,00	1	0,1	0,0	0,1	1,2	1,2	0,9	1,6	1,1	1,1	1,4	1,0	1,5	1,1	1,2	1,1	1,2	0,8	0,6
H4H13166P	1,3	0,00	14	0,0	0,0	0,0	0,1	0,9	0,7	1,1	0,9	0,8	1,0	0,8	1,0	0,6	0,8	0,7	0,8	0,5	0,4
H4H13148P	1,6	-0,01	5	1,5	0,7	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5	0,7	0,6
H4H13132P	1,3	0,00	2	1,0	0,9	0,8	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	-0,1	-0,1	0,3	0,3
H4H13143P	1,3	0,00	3	1,2	1,2	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,4	0,4
H4H13145P	1,5	-0,01	4	0,9	0,7	0,6	-0,1	0,0	-0,1	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	0,0	0,0	-0,1	-0,1	0,4	0,3
H4H13151P	1,4	0,00	6	1,3	1,2	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,4	0,4
H4H13152P	1,5	-0,01	7	0,8	0,7	0,7	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	0,4	0,4
H4H13155P	1,7	-0,02	9	1,2	1,0	0,7	-0,1	0,0	-0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,4
H4H13159P	1,6	0,00	11	1,3	1,2	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,4	0,4
H4H13162P	1,3	0,02	12	1,2	1,1	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3
H4H13163P	1,3	0,00	13	1,1	1,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,4	0,4
H4H13169P	1,3	0,01	16	1,1	1,1	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3
H4H13170P	1,2	0,02	17	1,0	1,1	0,7	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3
H4H13157P	1,3	0,00	10	1,2	1,1	0,9	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,5	0,2
H4H13153P	1,2	0,00	8	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	-0,1	-0,2	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,1	0,0	0,1
(-)изотипический контроль	1,3	0,01	18	0,1	0,0	0,0	-0,1	0,0	-0,2	0,0	-0,1	-0,3	-0,2	-0,1	0,0	-0,1	0,0	-0,2	-0,1	0,0	0,0

4/41



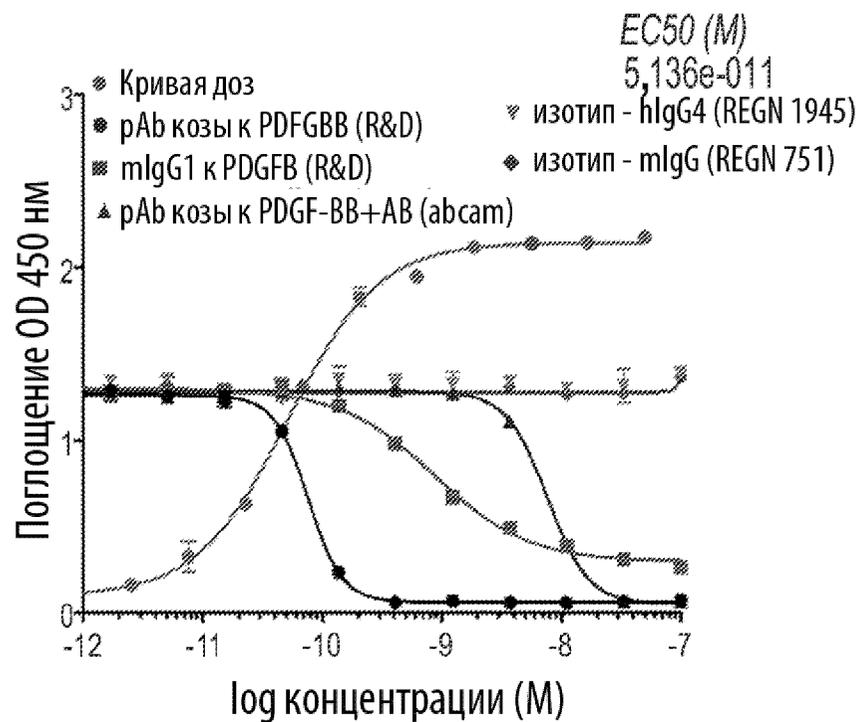
	H4H (-) контроль
	Двухнаправленная конкуренция
	Контроль для конкуренции при самосвязывании

Фиг. 4А

**Растворимый: биот.-PDGF-BB**

Ab-блокирование 60 пМ биот.-PDGF-BB (24,6 кДа)  
Связывание с 1 мкг/мл hPDGFRB-mmH (REGN979)

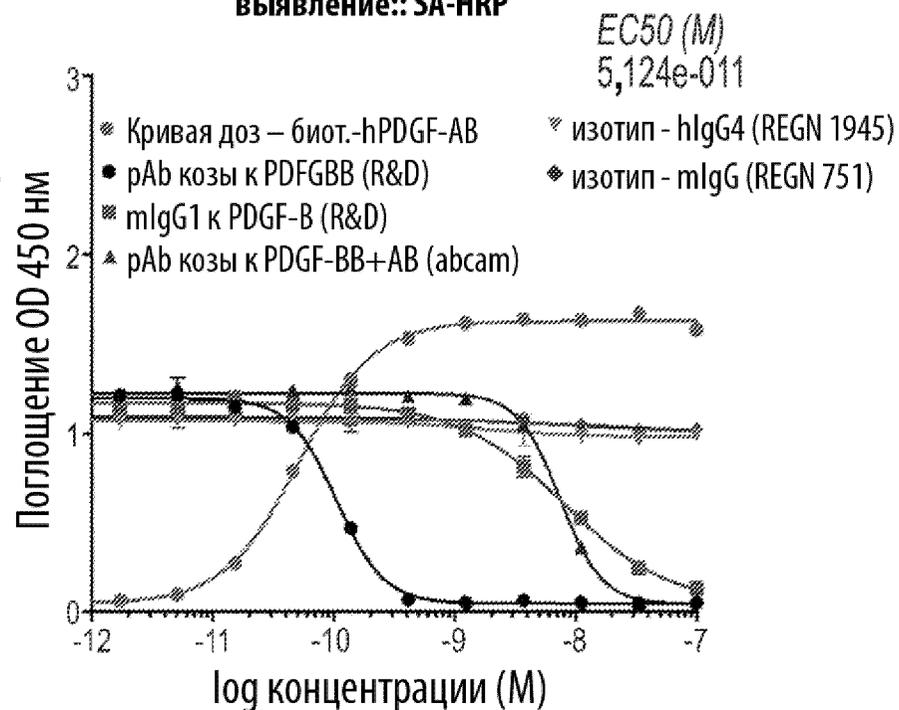
выявление:: SA-HRP



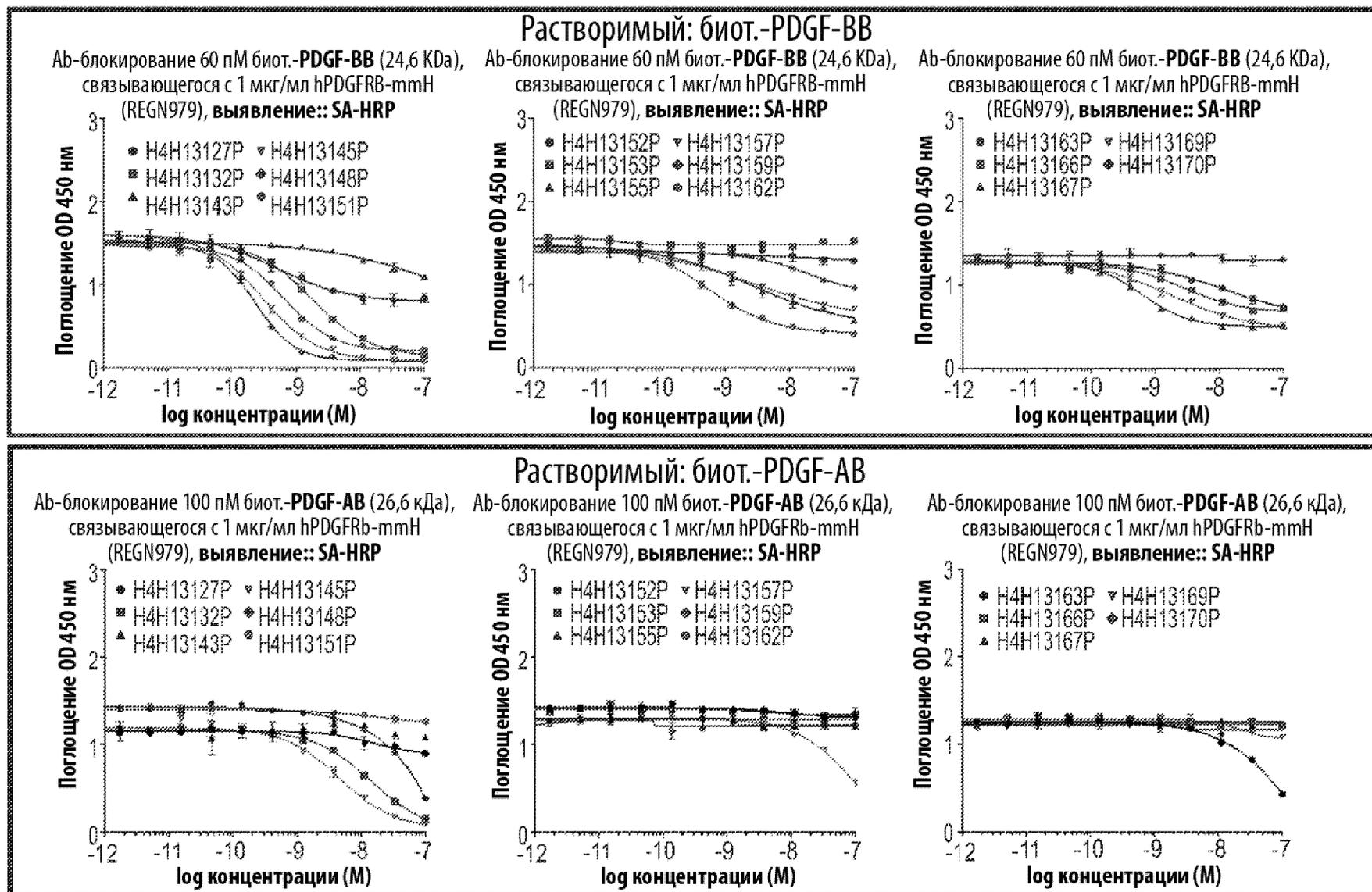
**Растворимый: биот.-PDGF-AB**

Ab-блокирование 100 пМ биот.-PDGF-AB (26,6 кДа)  
Связывание с 1 мкг/мл hPDGFRB-mmH (REGN979)

выявление:: SA-HRP



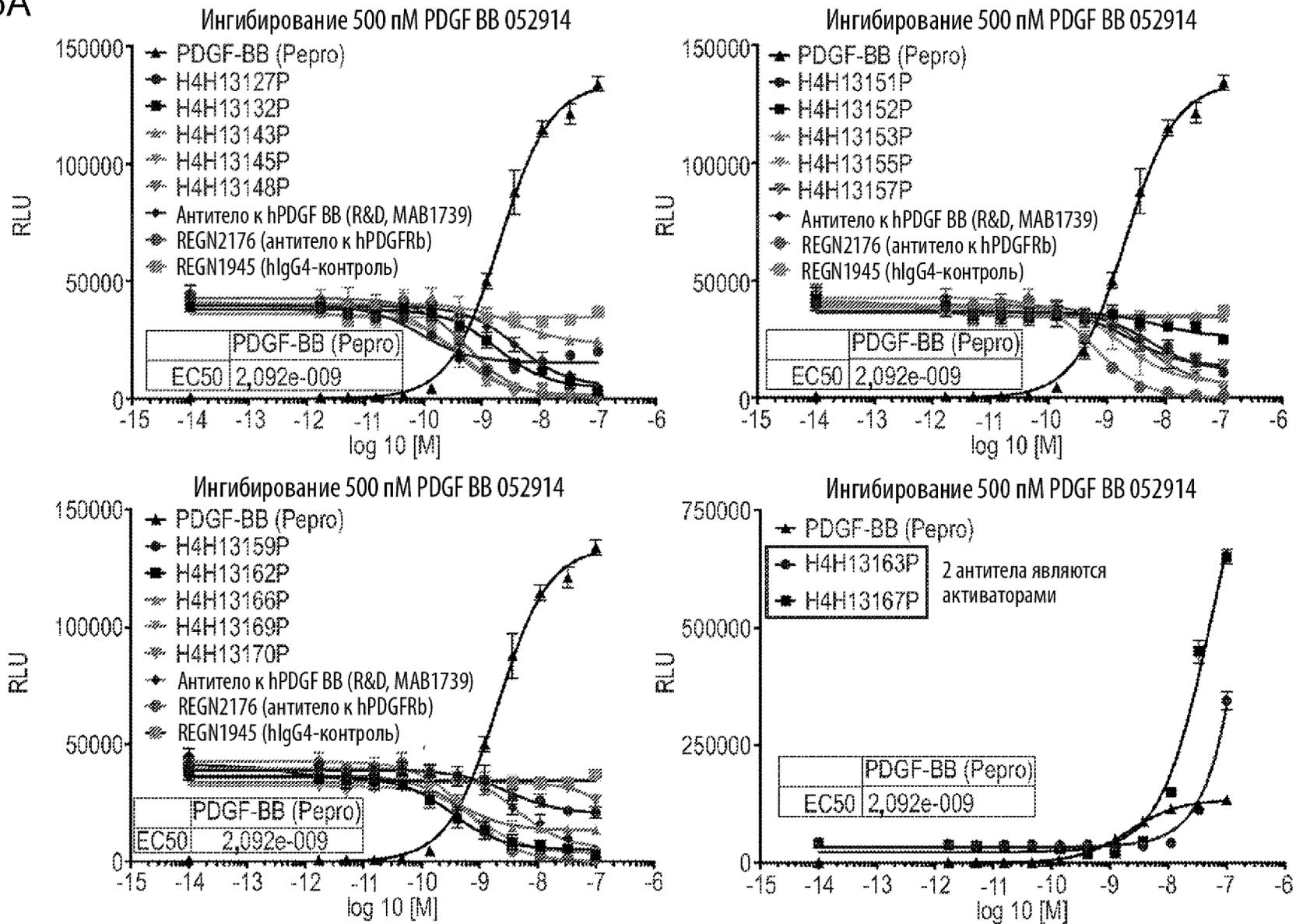
Фиг. 4В



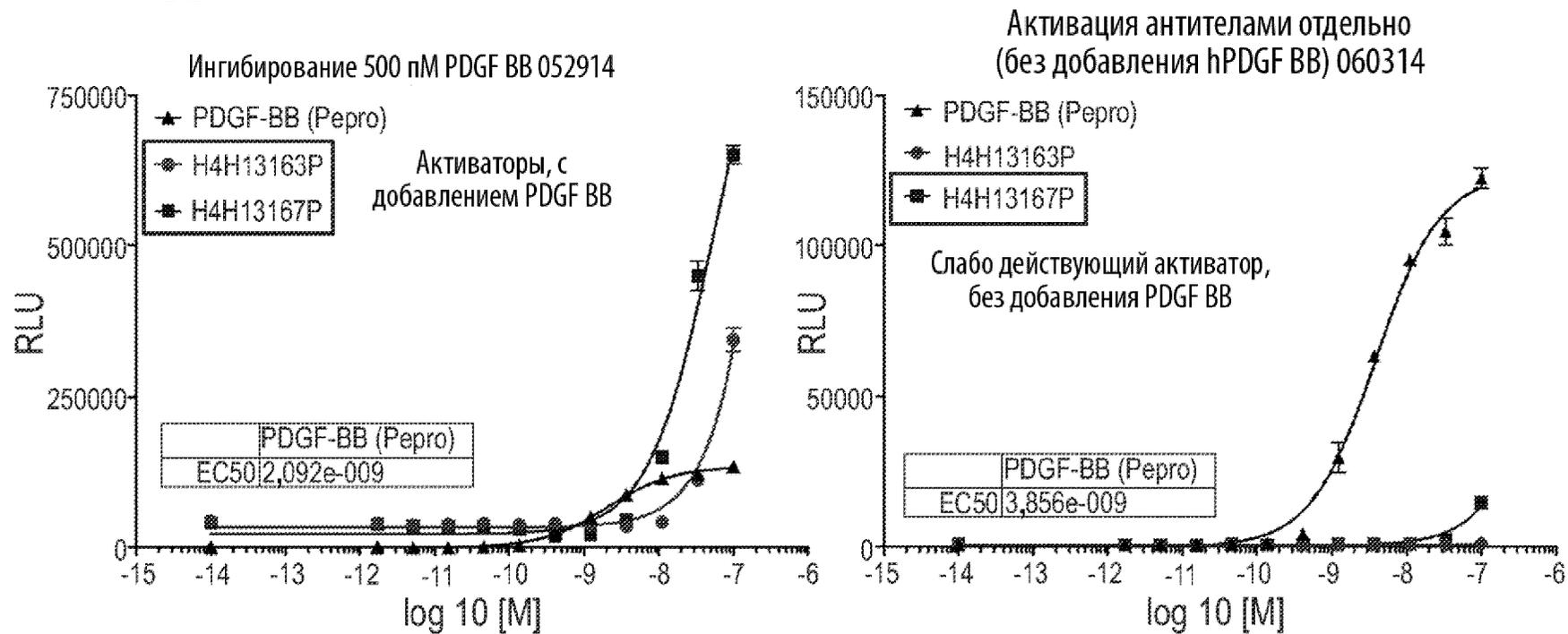
Фиг. 4С

AB PID	Ab-блокирование 60 пМ биот.-PDGF-BB (димер) на 1 мкг/мл hPDGFRb-ммН, IC50 (M)	100 нМ Ab-блокирование 60 пМ биот.-PDGF-BB (димер) на 1 мкг/мл hPDGFRb-ммН, % блокирования	Ab-блокирование 100 пМ биот.-PDGF-AB (димер) на 1 мкг/мл hPDGFRb-ммН, IC50 (M)	100 нМ Ab-блокирование 100 пМ биот.-PDGF-AB (димер) на 1 мкг/мл hPDGFRb-ммН, % блокирования
H4H13148P	2,3E-10	102	INC	73
H4H13145P	3,0E-10	101	4,6E-09	97
H4H13132P	1,8E-09	96	1,4E-08	92
H4H13162P	5,5E-10	75	NB	1
H4H13151P	6,4E-10	90	NB	-2
H4H13157P	2,8E-09	50	1,1E-07	57
H4H13163P	1,3E-08	48	1,9E-07	68
H4H13167P	6,4E-10	66	NB	2
H4H13169P	1,7E-09	67	NB	14
H4H13155P	2,6E-09	61	NB	2
H4H13166P	2,8E-09	50	NB	2
H4H13127P	5,1E-10	40	1,5E-08	29
H4H13159P	2,0E-08	29	NB	2
H4H13143P	NB	18	NB	13
H4H13152P	NB	3	NB	-7
H4H13170P	NB	1	NB	1
H4H13153P	NB	-17	NB	-9
<b>КОНТРОЛИ</b>				
поликл. антитело козы к PDGF-BB+AB (abcam, ab34074)	7,7E-09	103	7,4E-09	99
поликл. антитело козы к PDGF-BB+AB (R&D, AF-220-NA)	7,6E-11	102	1,1E-10	100
mlgG1 к PDGFB (R&D, MAB1739)	8,7E-10	87	8,0E-09	93
изотип - hlgG4 (REGN 1945)	NB	-6	NB	21
изотип - mlgG4 (REGN 751)	NB	-5	NB	18
Теоретическая нижняя граница	< 3,0E-11		< 5,0E-11	
Блокирует >70%		≥70%		≥70%
Блокирует 45-70%		40-75%		40-75%
Блокирует <25% - IC50 не показано, не считается блокатором (NB)				

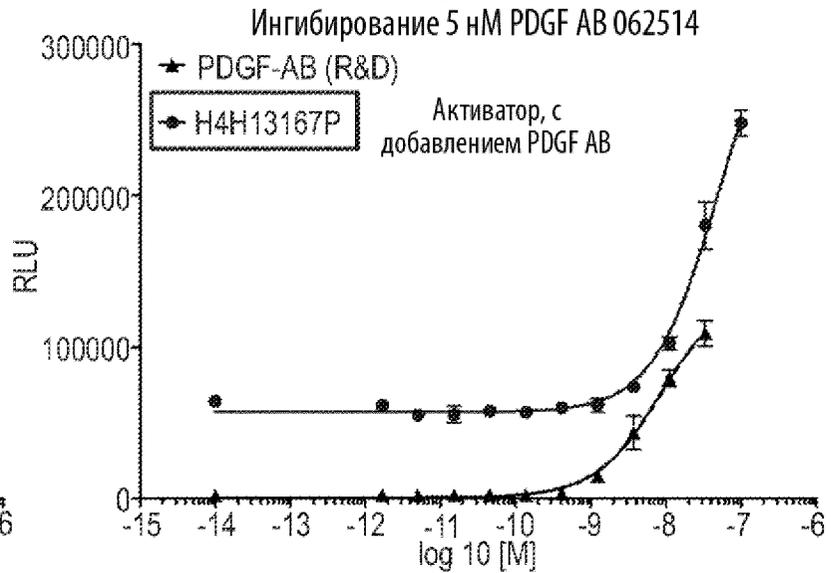
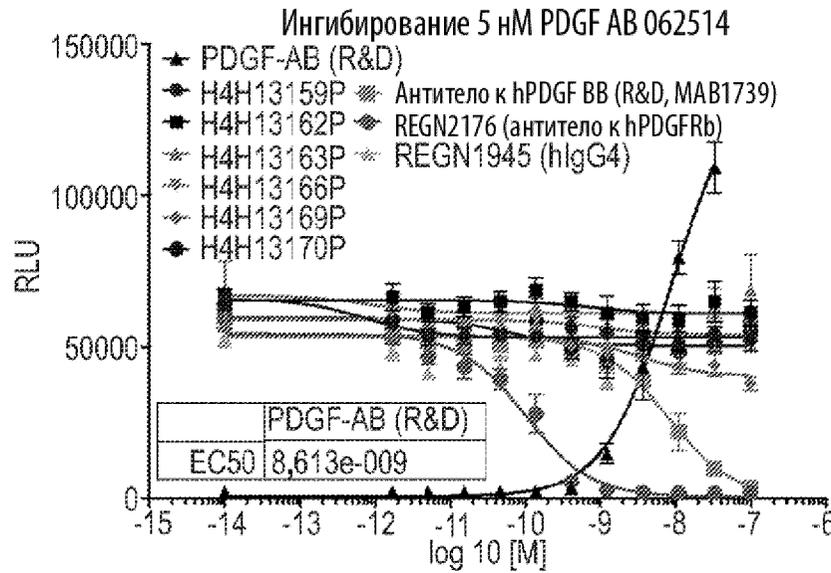
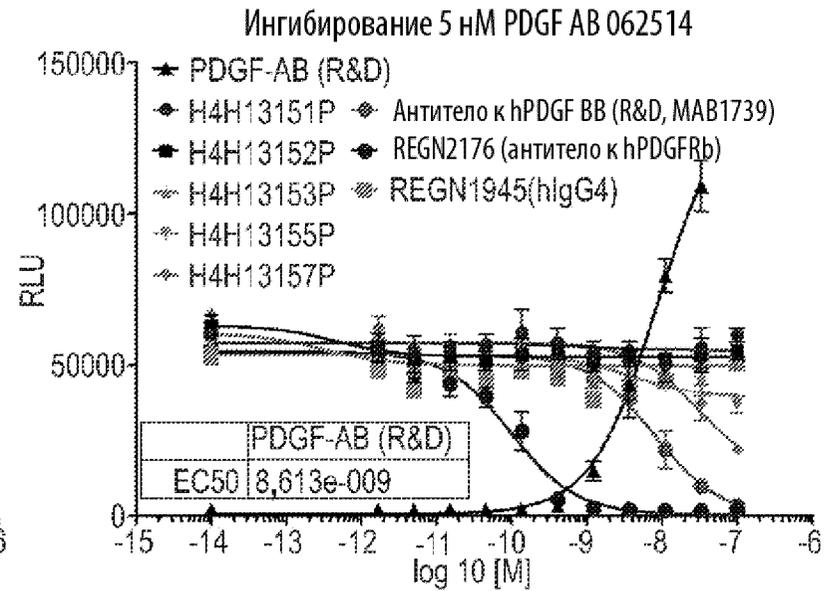
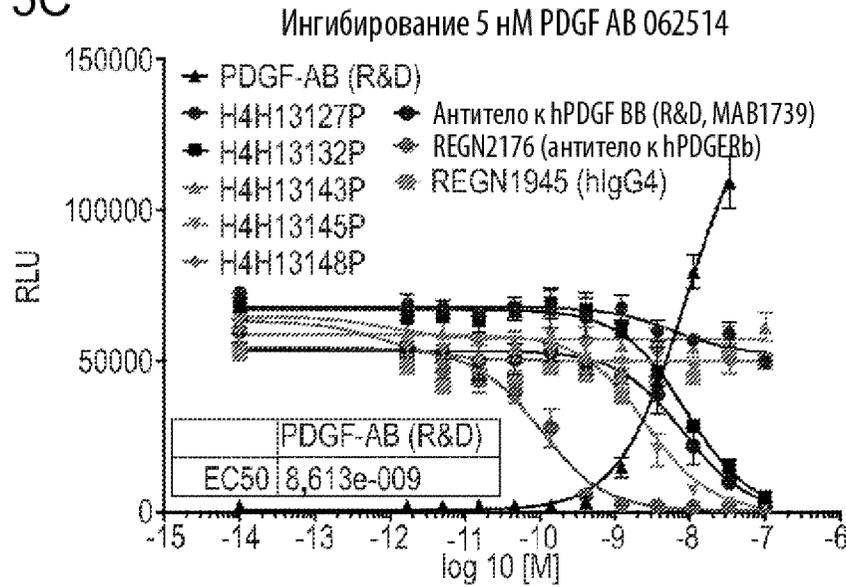
Фиг. 5А



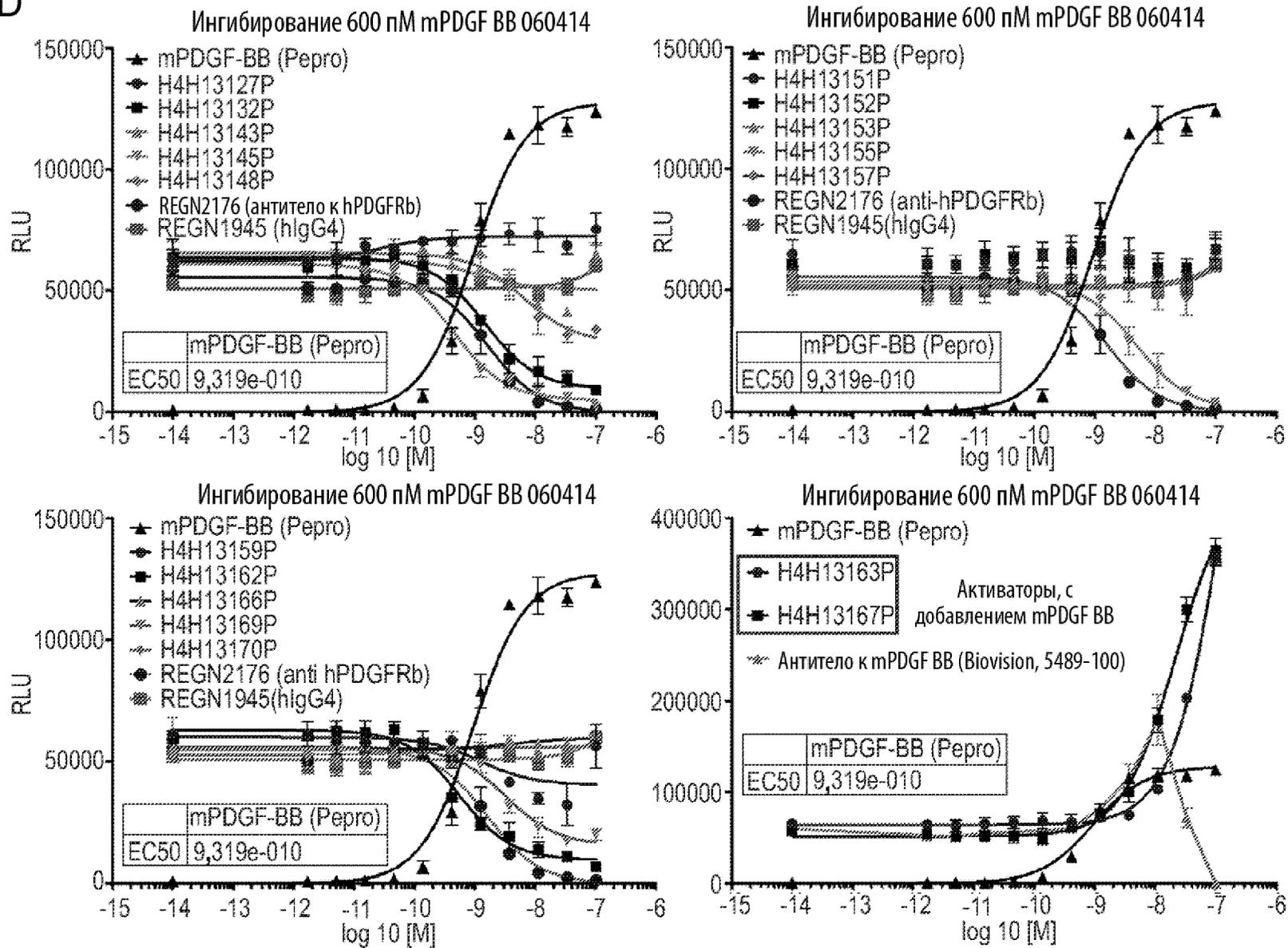
Фиг. 5В



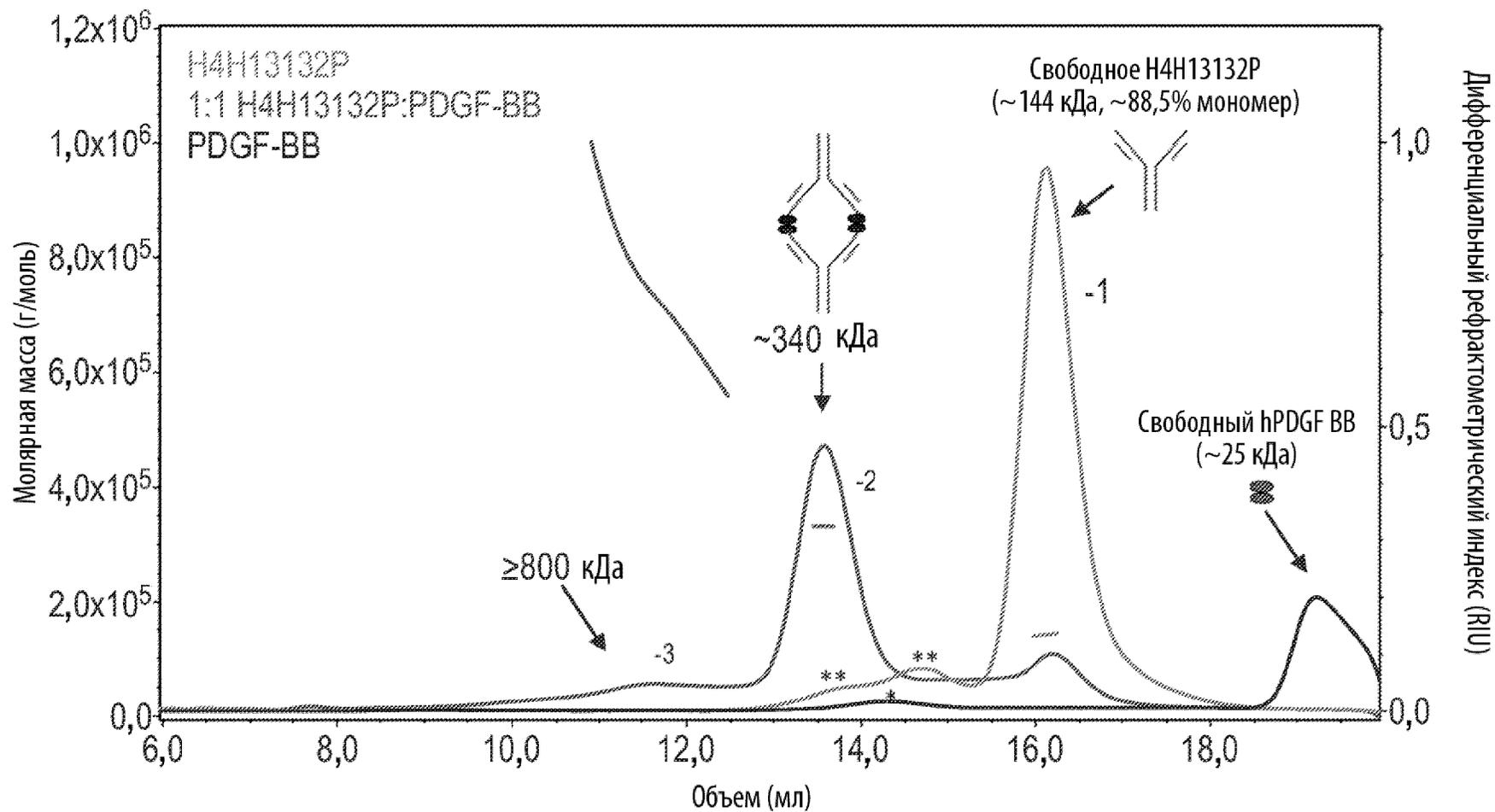
Фиг. 5С



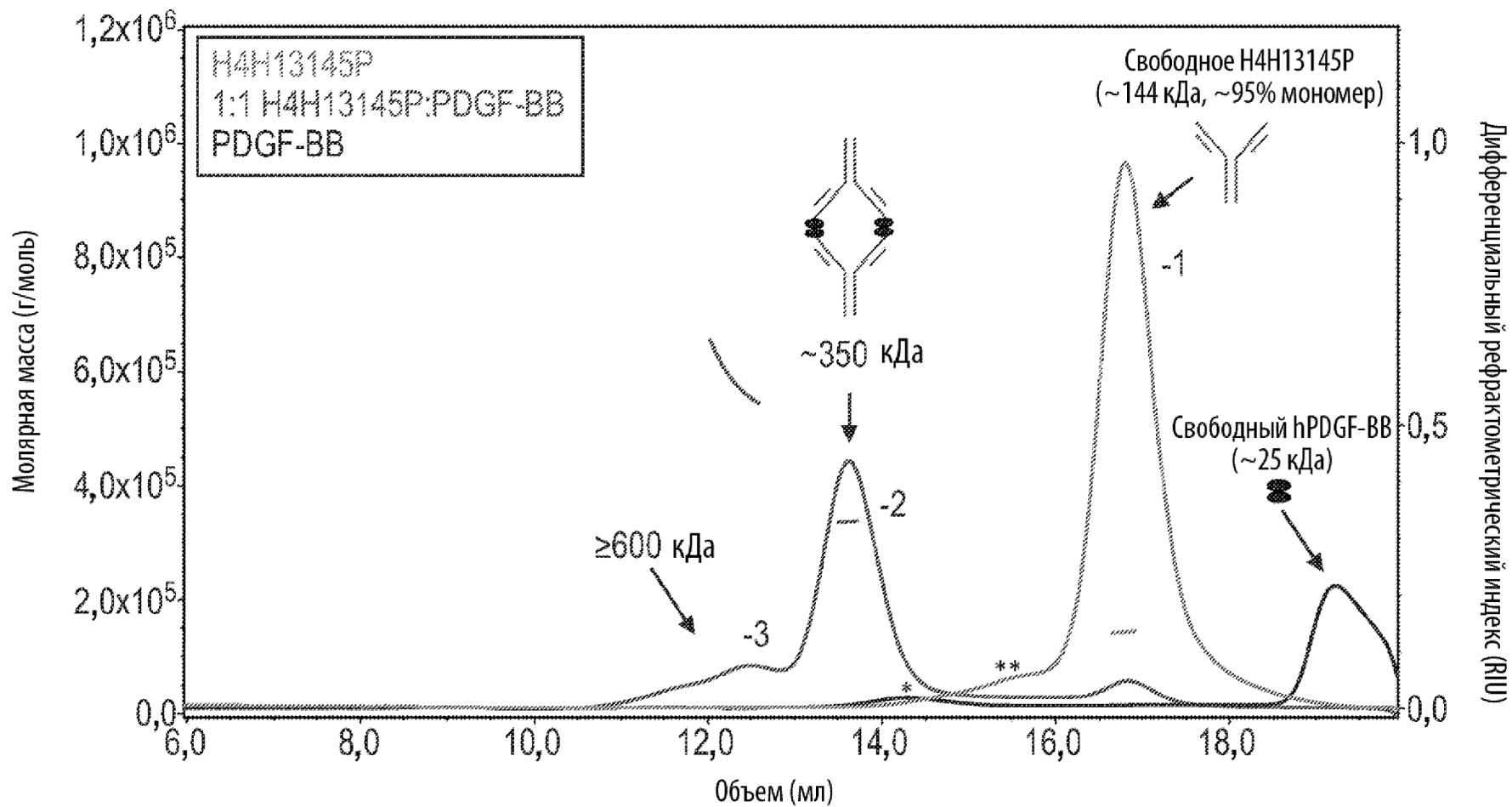
Фиг. 5D



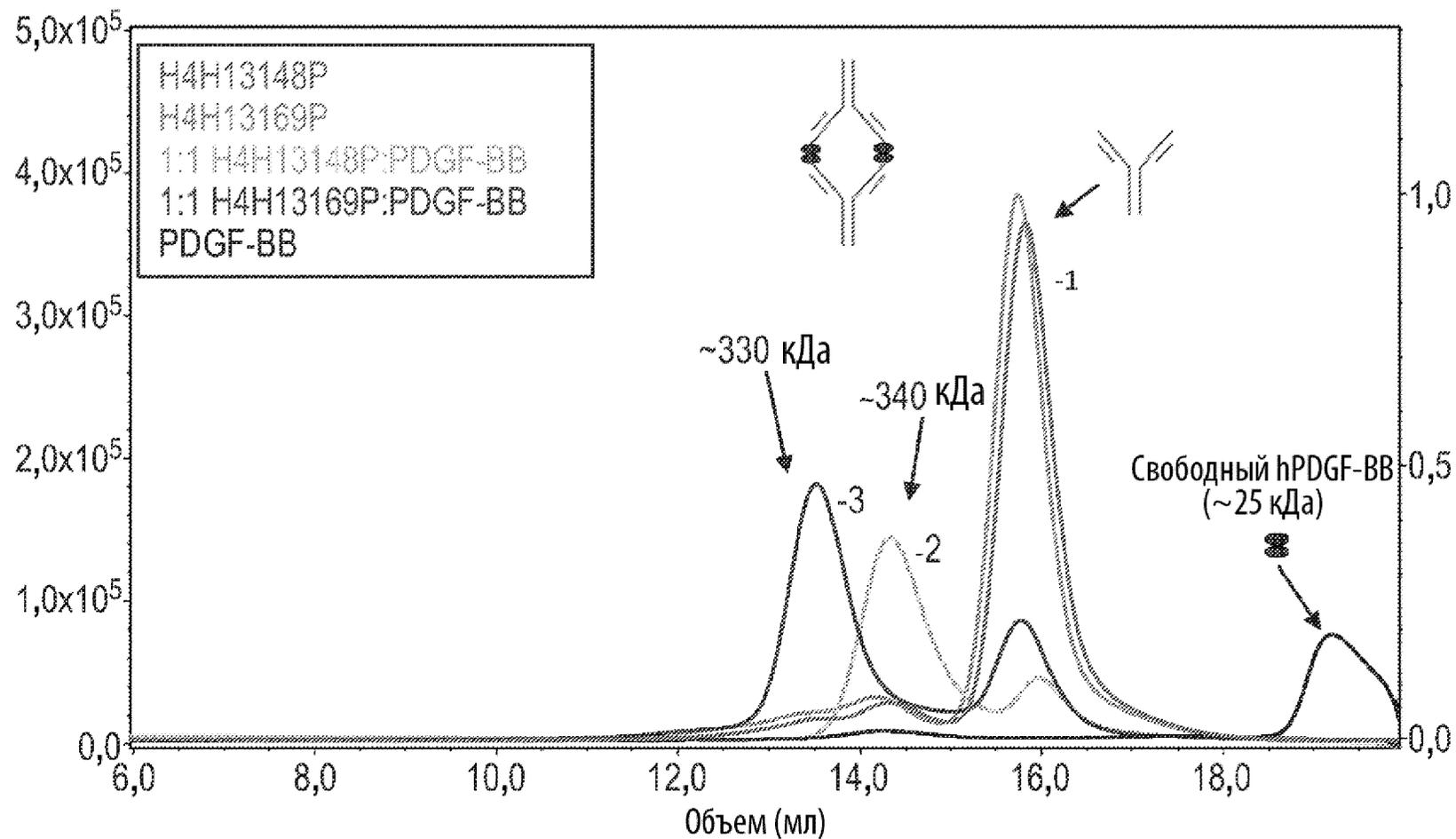
Фиг. 6А



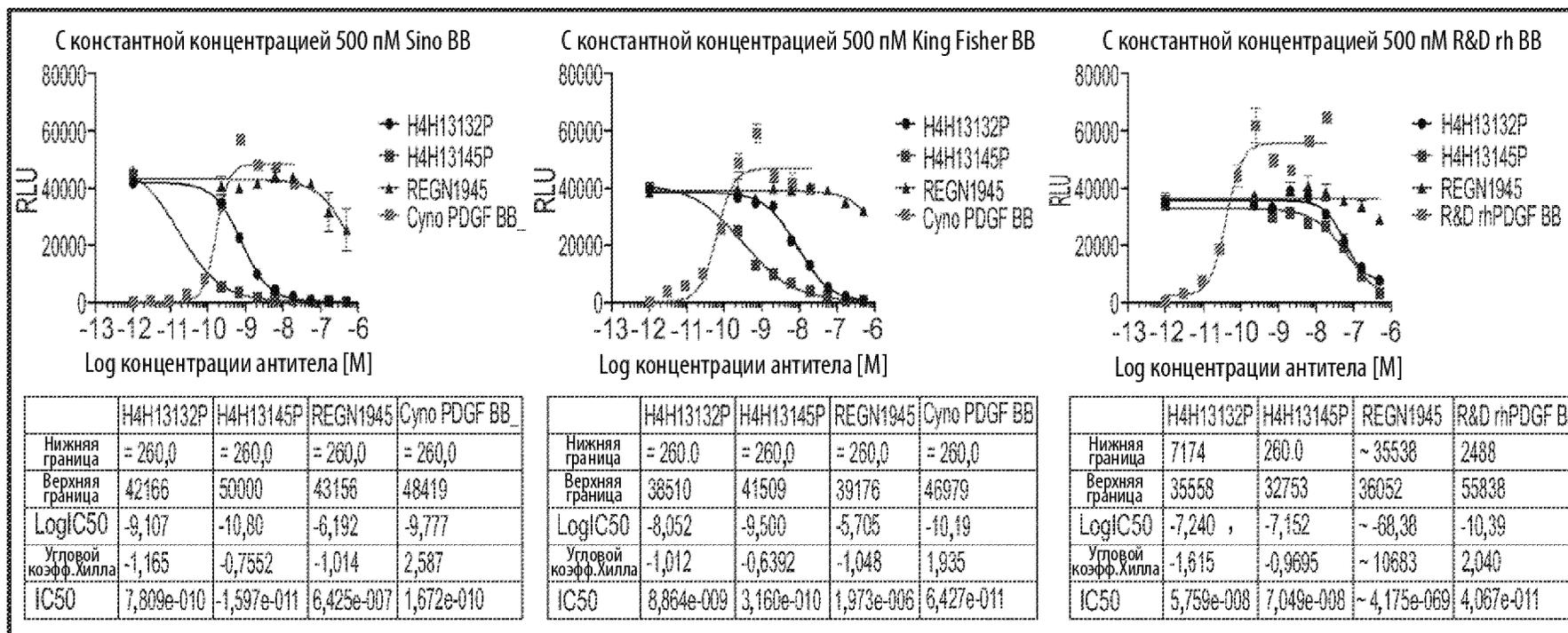
Фиг. 6В



Фиг. 6С



Фиг. 7



	EC <sub>50</sub> (пМ)
SinoBio Mf-BB	167
KingFisher Mf-BB	64
R&D hu-BB	41

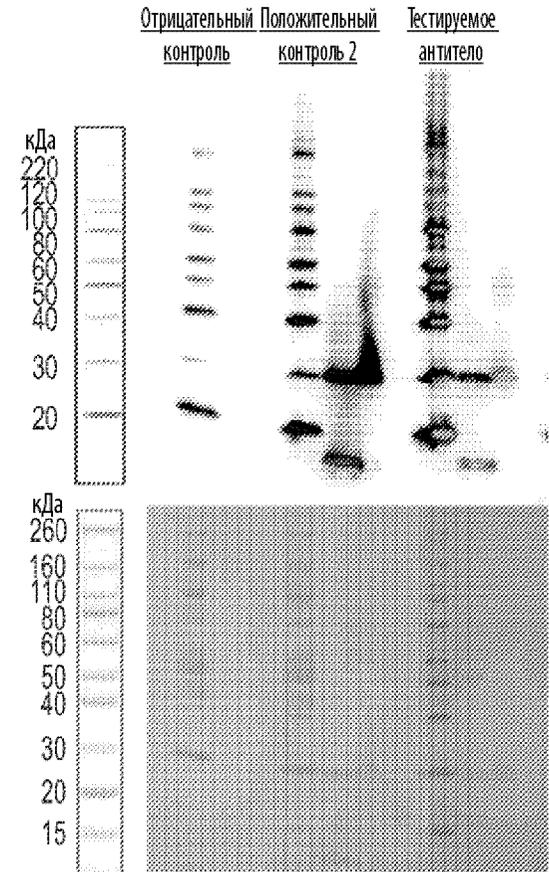
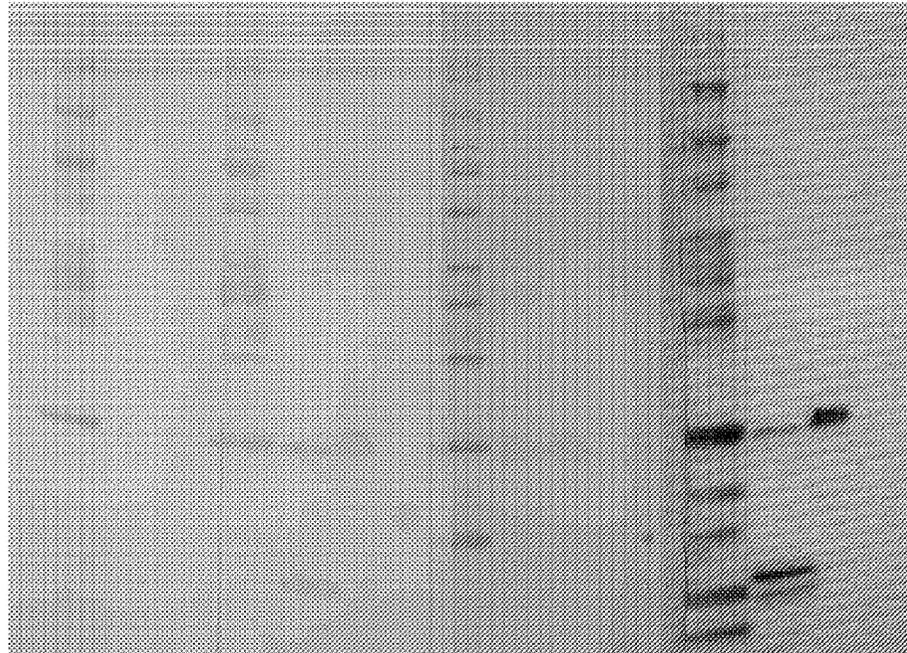
С константной концентрацией 500 пМ BB	H4H13132P		H4H13145P	
	IC50 (пМ)	% Ингибирования	IC50 (пМ)	% Ингибирования
SinoBio Mf-BB	781	100	16	100
KingFisher Mf-BB	8864	98,5	316	99,1
R&D hu-BB	57590	78,8	70490	91,3

Фиг. 8

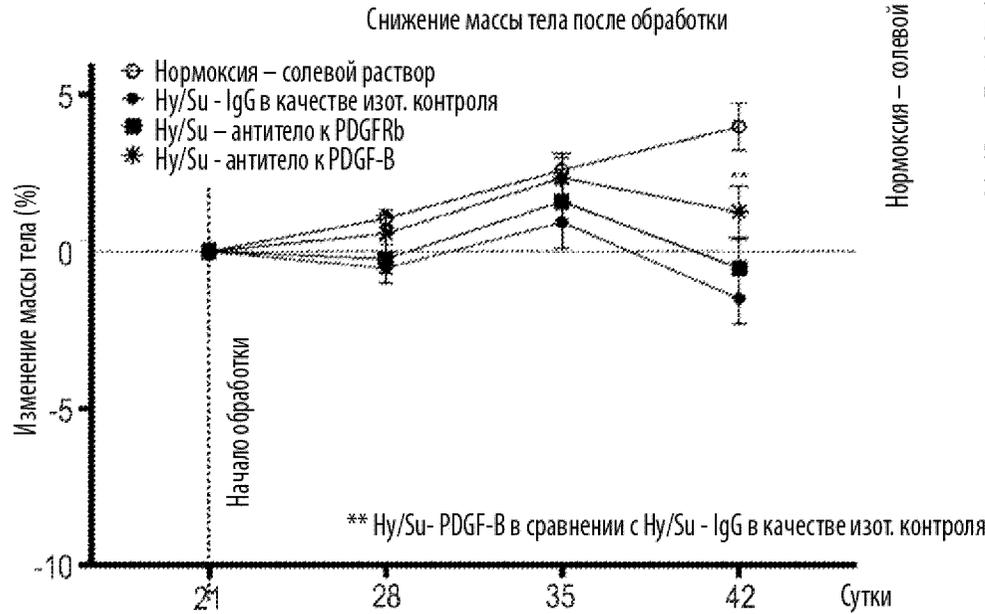
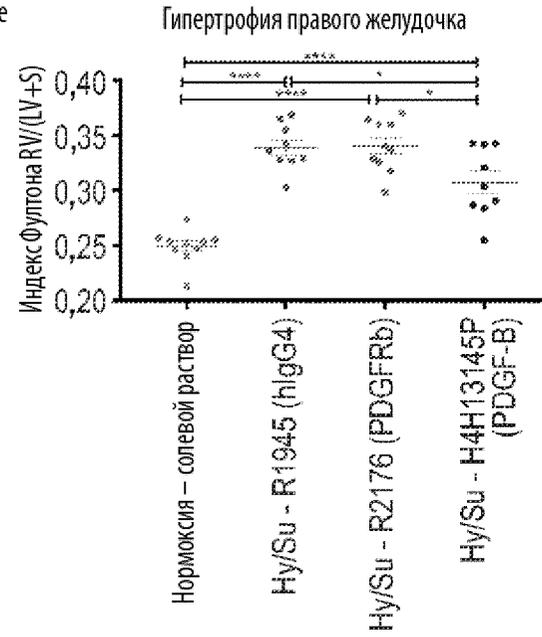
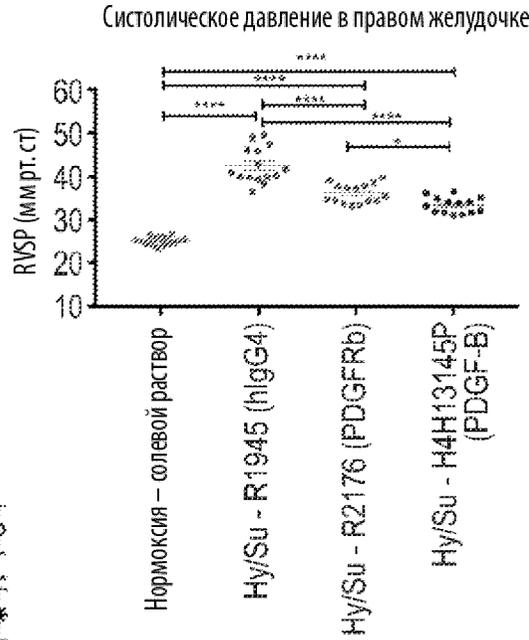
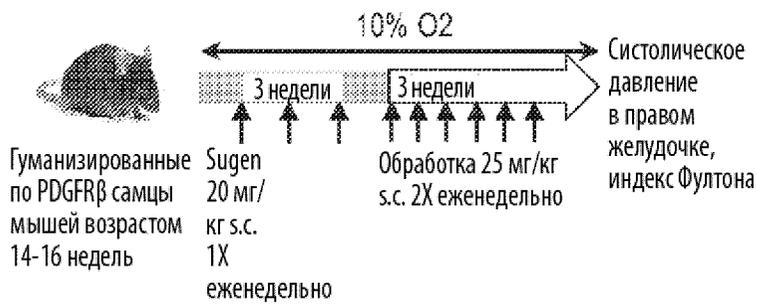
Ab PID # / REGN #	№ партии	Описание поверхности захвата	Гомодимер PDGF-BB человека (R&D)						Гомодимер PDGF-BB обезьяны (Kingfisher)						Гомодимер PDGF-BB Fc обезьяны - Fc (IgG1)-метка мыши (Sino Biological)					
			Захват mAb (RU)	Связанный hPDGF-BB (R&D) при 30 нМ (RU)	ka (1/мс)	kd (1/с)	KD (M)	t½ (мин)	Захват mAb (RU)	Связанный mPDGF-BB (King Fisher) при 30 нМ (RU)	ka (1/мс)	kd (1/с)	KD (M)	t½ (мин)	Захват mAb (RU)	Связанный mPDGF-BB (Sino) при 30 нМ (RU)	ka (1/мс)	kd (1/с)	KD (M)	t½ (мин)
H4H13 132P	L1	Антитело к PDGF-B	249 ± 1,7	48,4	2,60E+06	5,01E-05	1,93E-11	230,5	257,6 ± 1,5	50,3	4,31E+06	4,17E-05	9,67E-12	277,2	271,2 ± 2,6	116,7	4,09E+05	1,05E-05	2,56E-11	1102,3
H4H13 145P	L2	Антитело к PDGF-B	297,8 ± 21,5	62,2	1,09E+06	3,09E-05	2,82E-11	374,2	300,1 ± 13,5	73,4	9,30E+05	1,50E-05	1,61E-11	769,7	340 ± 11,4	151,5	4,04E+05	1,08E-05	2,68E-11	1066,7
REGN1 945	L49	Антитело к FeID1	356,7 ± 0,8	6,7	NB	NB	NB	NB	359,9 ± 1,1	6,8	NB	NB	NB	NB	367,4 ± 0,5	-1,4	NB	NB	NB	NB

Фиг. 9

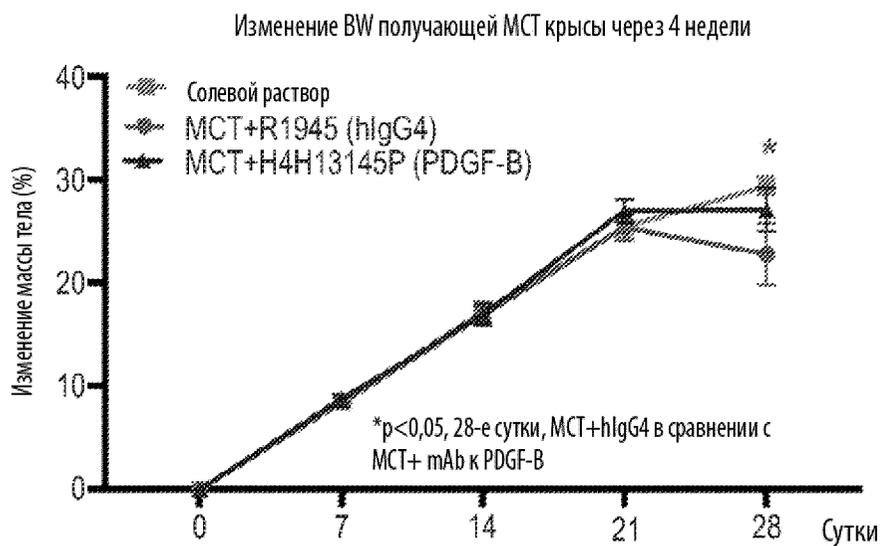
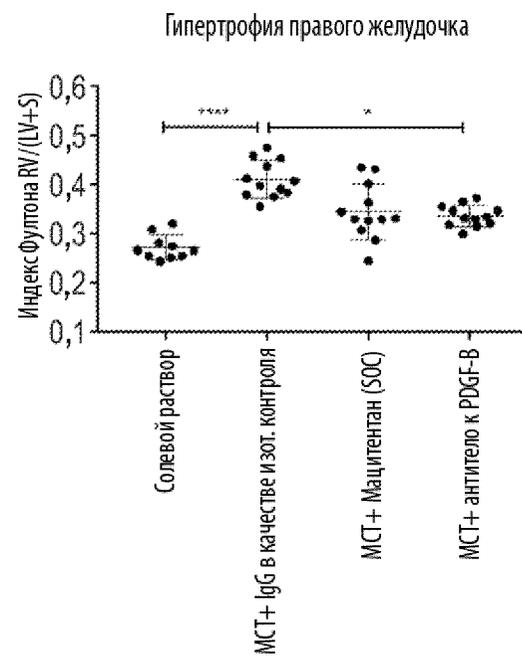
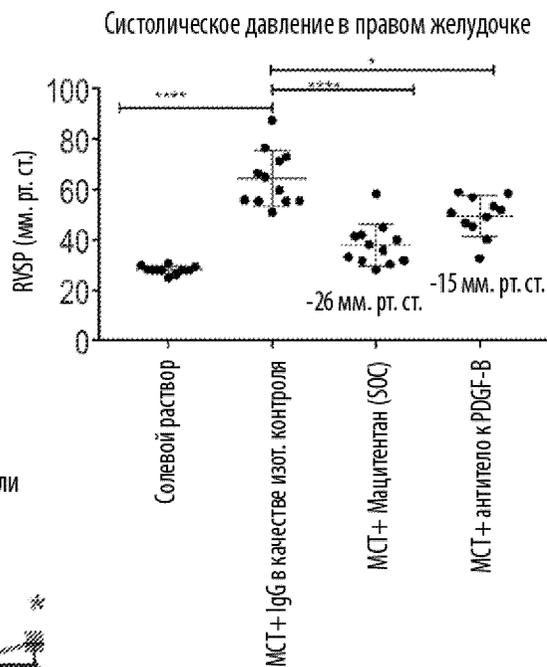
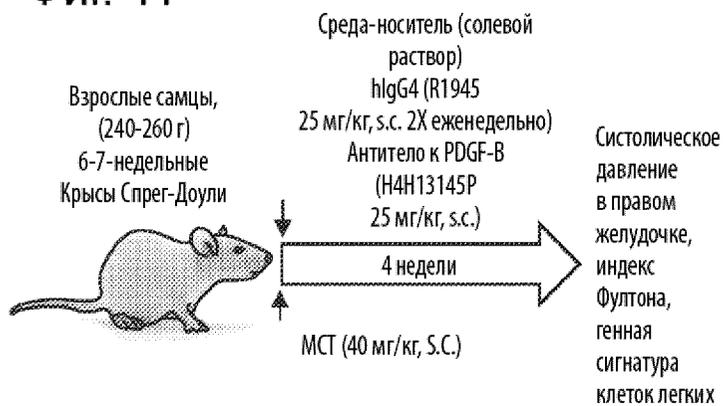
	Часть 1							Часть 2						
	Отрицательный контроль			Положительный контроль 2			Тестируемое антитело	Положительный контроль 1						
	1-1		Пропуск	1-2		Пропуск	1-3		Пропуск	Окрашивание геля коллоидным Coomassie G-250			Пропуск	
Набор маркеров MW белков	Только Ab в качестве стр. контроля			Набор маркеров MW белков	Контрольное Ab R&D		Набор маркеров MW белков	H4H13145P		Набор маркеров MW белков	R	NR		Пропуск
Карта загрузки образцов: 1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
Буфер для внесения (10 мкл)	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Образец: маркер tag1c (5 мкл)	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
PDGF-BB человека, 1 мкг (денатурирующие, восстанавливающие условия)	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
PDGF-BB человека, 1 мкг (невосстанавливающие условия)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-



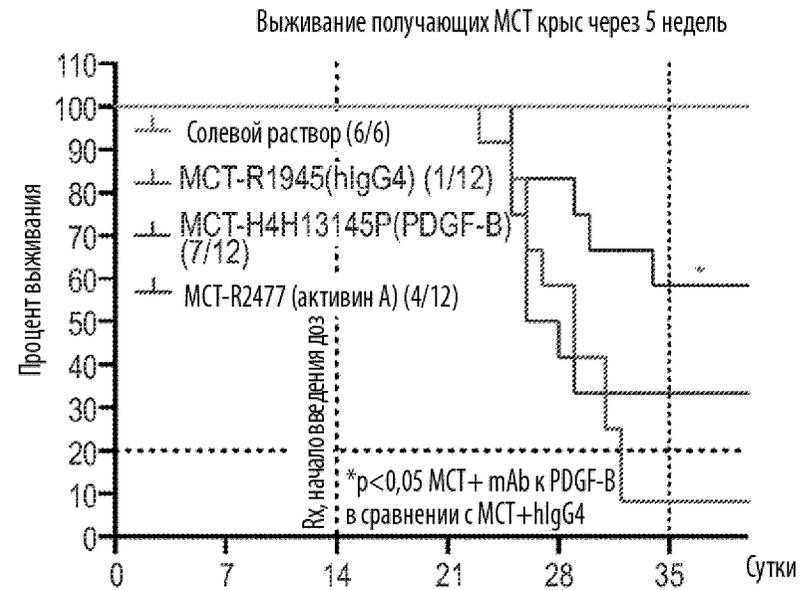
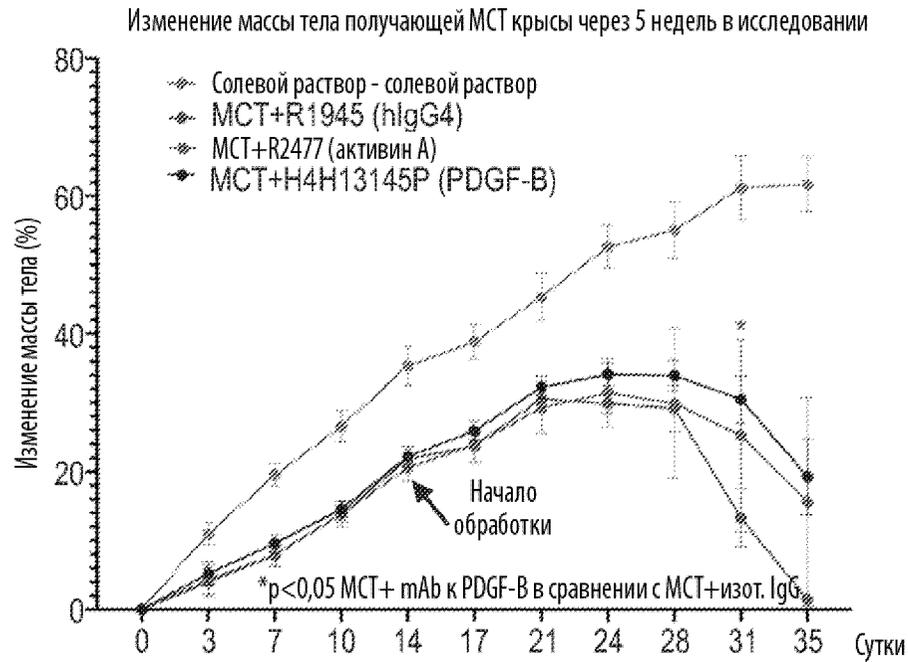
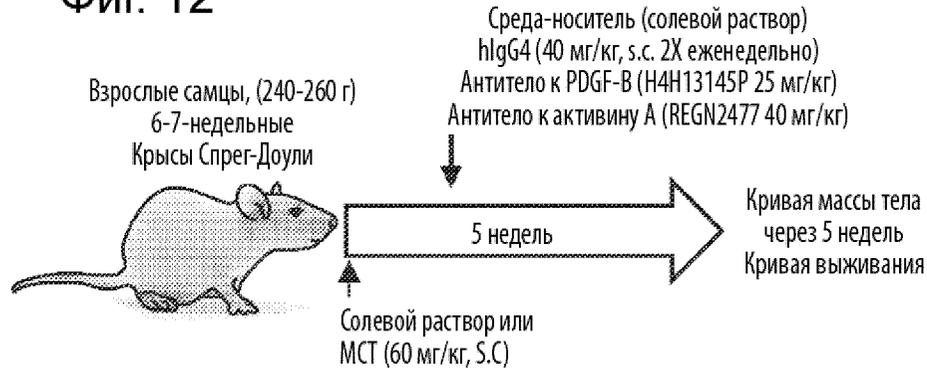
Фиг. 10



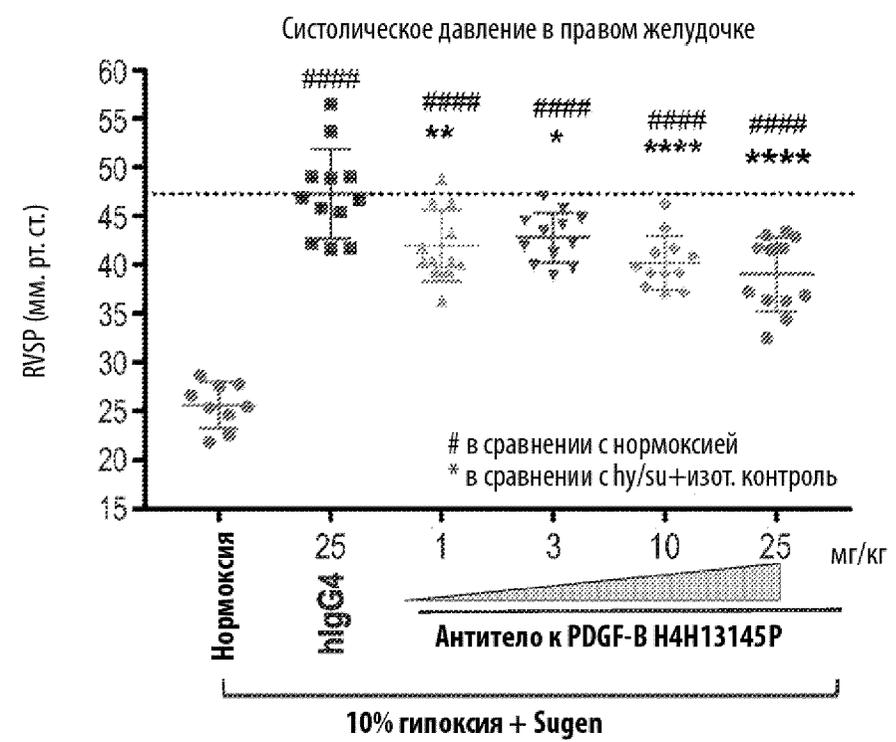
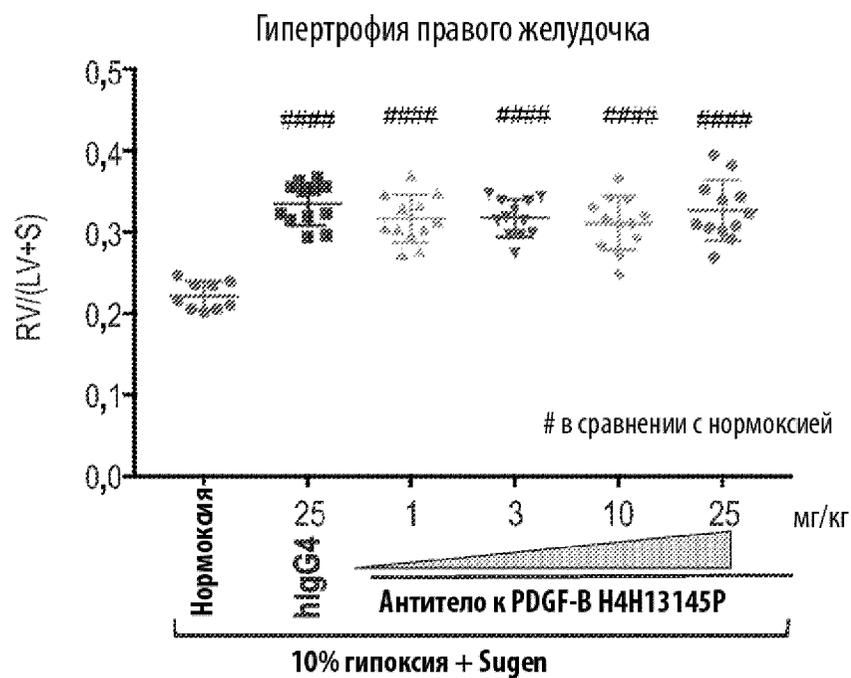
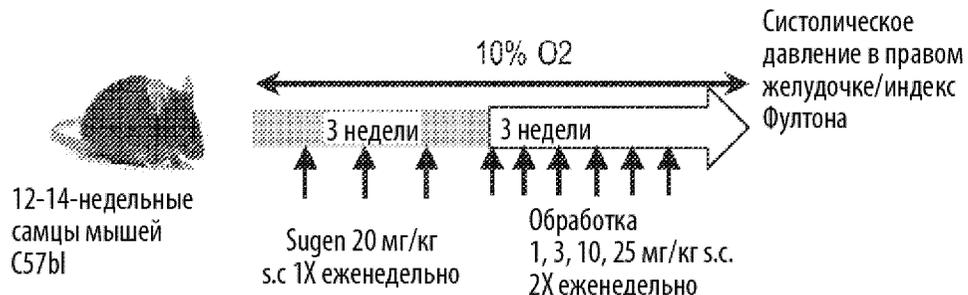
Фиг. 11



Фиг. 12

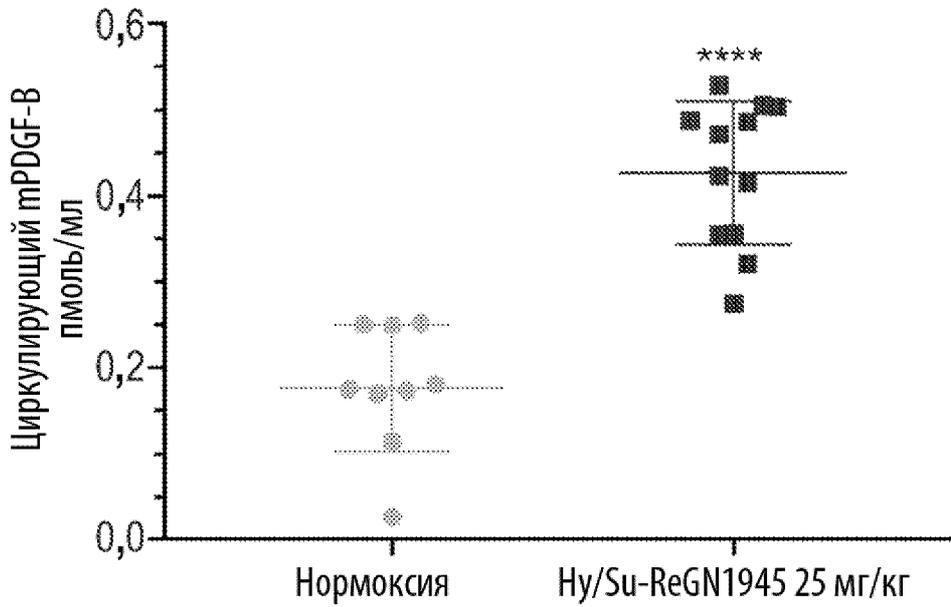


Фиг. 13А

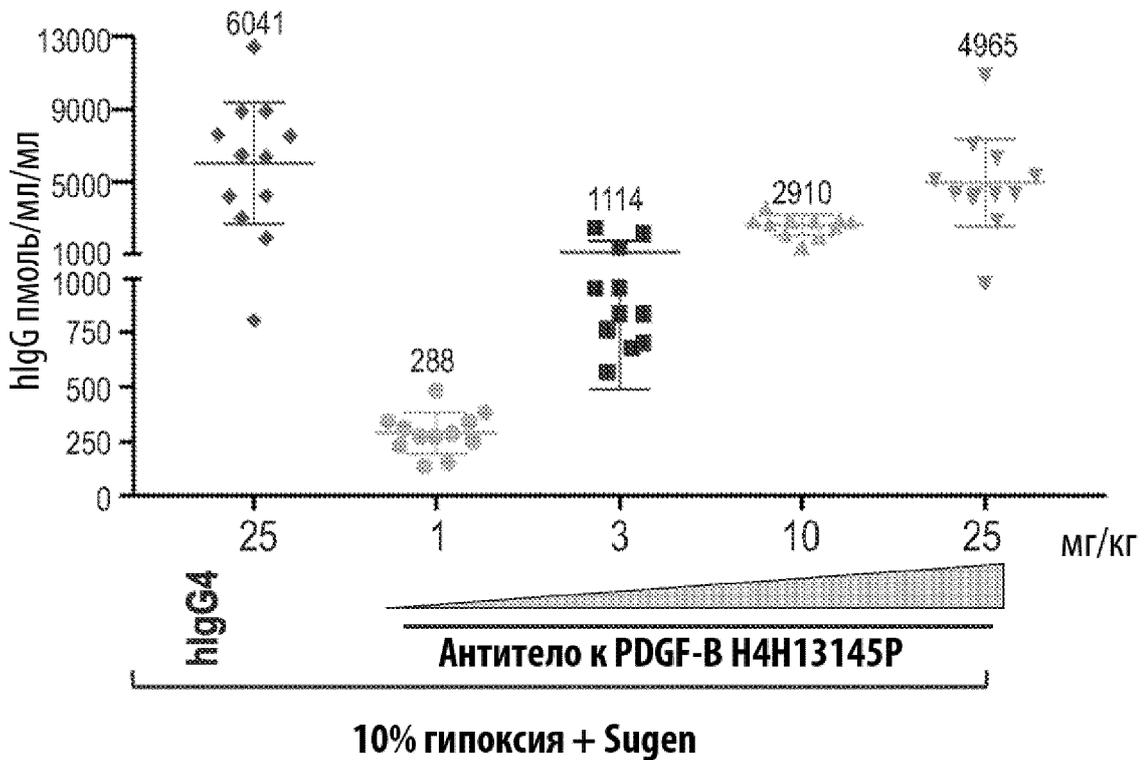


Фиг. 13В

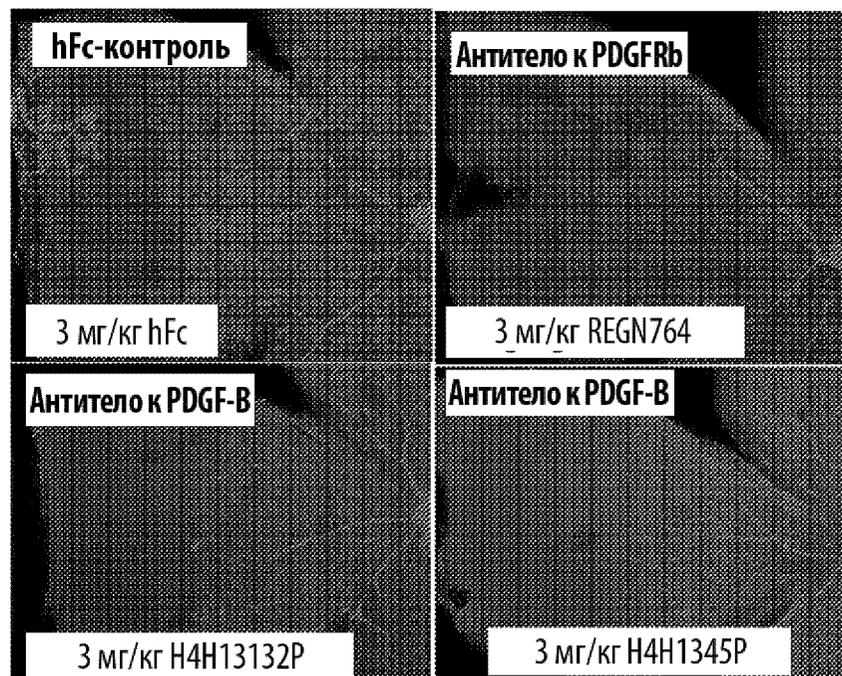
PDGF-B в сыворотке крови у Ну/Su мышей через 6 недель



Уровень лекарственного средства у Ну/Su мышей

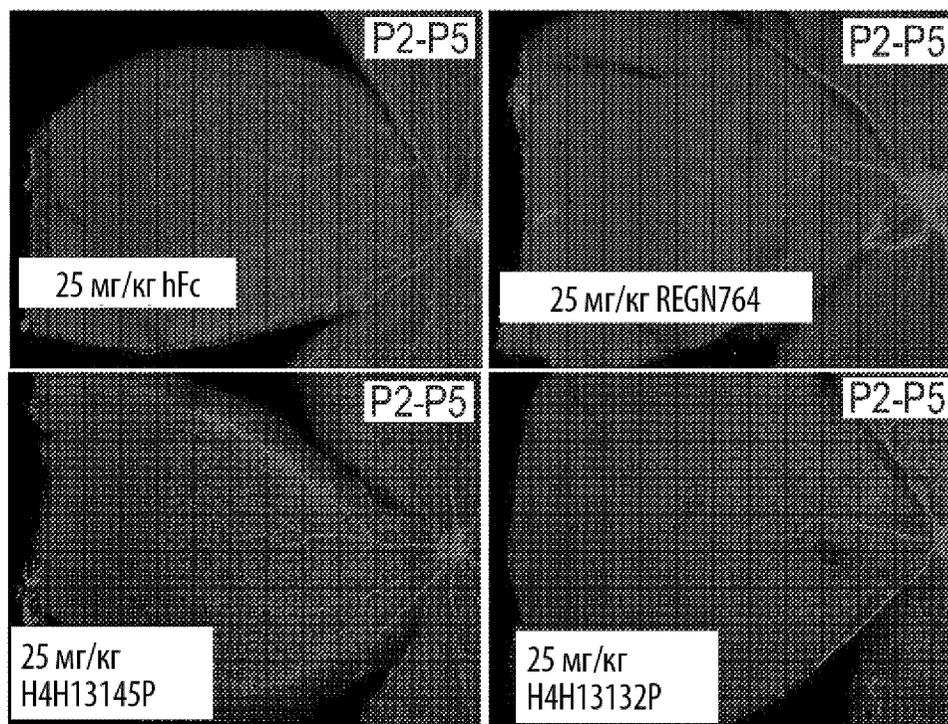


Фиг. 14

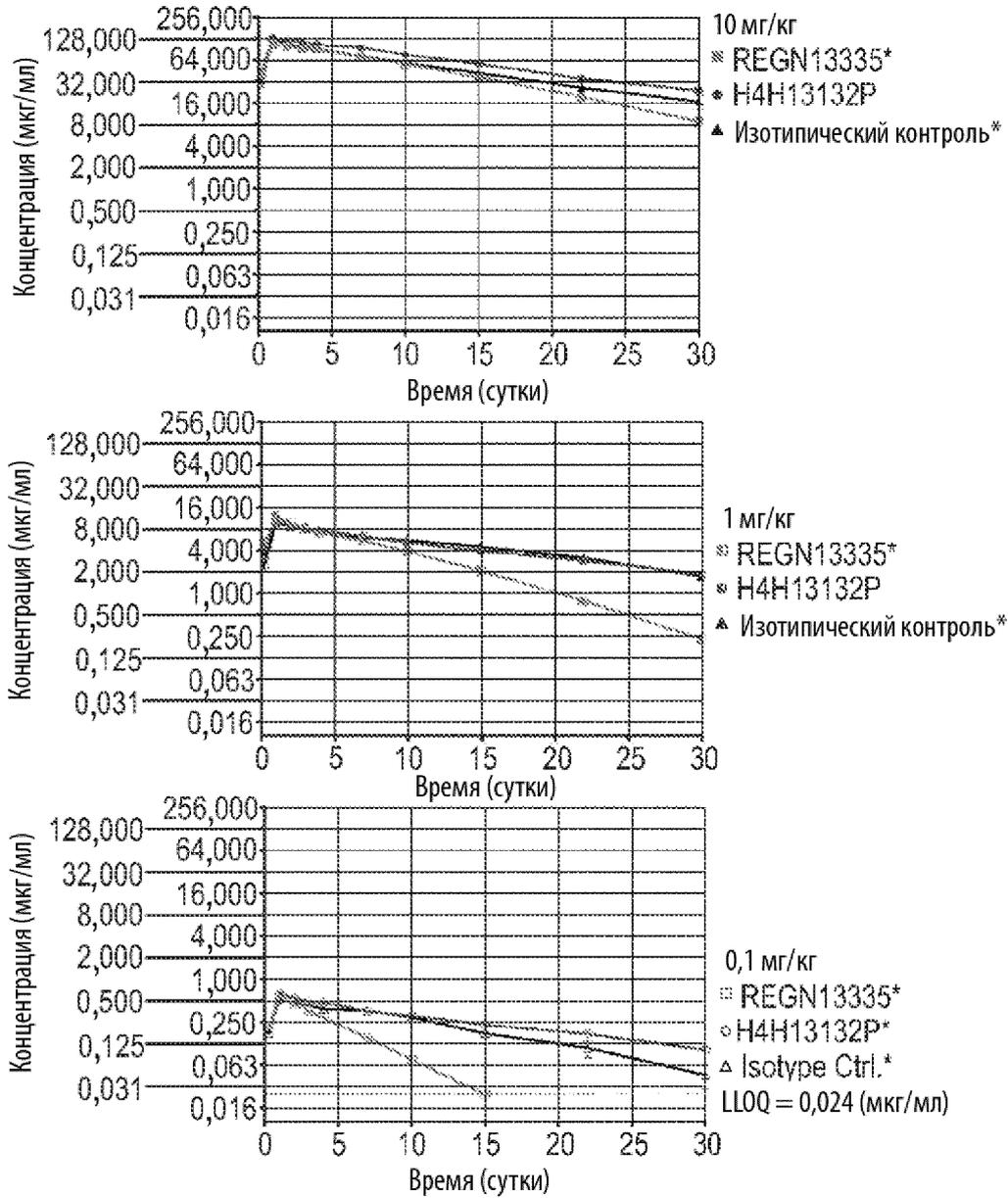


Антитело к PDGFR-BB

Фиг. 15



Фиг. 16



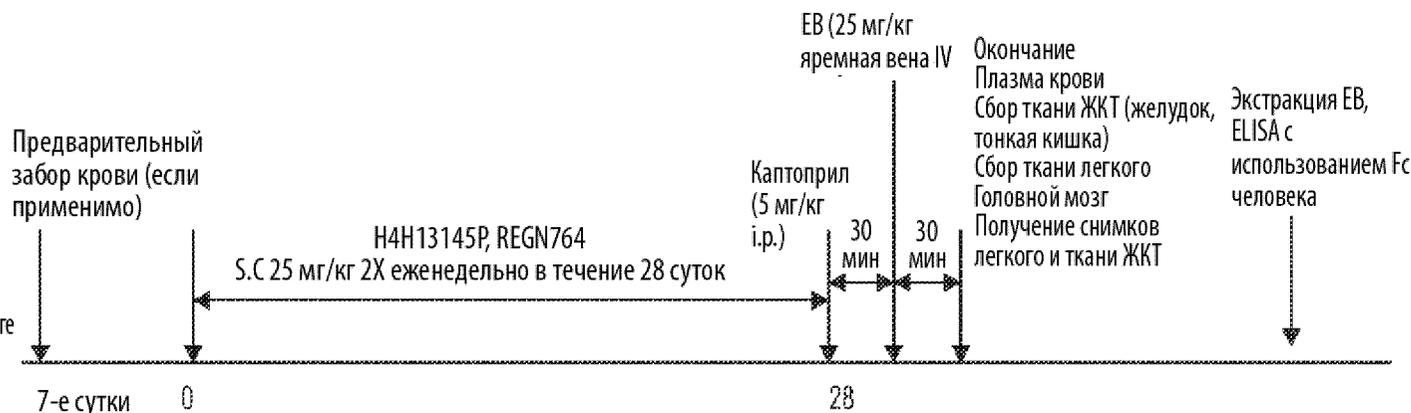
ПК-параметры на 30-е сутки								
Мыши C57BL/6WT								
Доза (мг/кг)	Лекарственное средство	T <sub>1/2</sub> (сутки)	C <sub>max</sub> (мкг/мл)	C <sub>max_D</sub> (кг*мкг/мл/мл)	AUClast (сутки*мкг/мл)	AUClast/D ((сутки*мкг/мл)/(мг/кг))	Cl_F_obs (мл/сутки/кг)	n=
10	REGN13335	8,14 ± 0,62	104 ± 2,4	10,4 ± 0,24	1300 ± 49	130 ± 4,9	7,14 ± 0,37	3
	H4H13132P	11,7 ± 0,71	129 ± 4,8	12,9 ± 0,48	1840 ± 50	184 ± 5	4,48 ± 0,13	4
	Isotype Ctrl.	10,4 ± 1,3	124 ± 1,8	12,4 ± 0,18	1420 ± 91	142 ± 9,1	6,03 ± 0,63	2
1	REGN13335	5,33 ± 0,15	10,5 ± 0,27	10,5 ± 0,27	94 ± 1,5	94 ± 1,5	10,5 ± 0,18	4
	H4H13132P	12 ± 0,1	12,2 ± 0,29	12,2 ± 0,29	136 ± 5,7	136 ± 5,7	6 ± 0,26	3
	Изотипический контроль	12,6 ± 0,53	9,6 ± 0,32	9,6 ± 0,32	140 ± 2,9	140 ± 2,9	5,85 ± 0,21	3
0.1	REGN13335	3,17 ± 0,12	0,563 ±	5,61 ± 0,2	2,69 ± 0,16	26,9 ± 1,6	35,3 ± 2	4
	H4H13132P	11,8 ± 0,6	0,613 ±	6,13 ± 0,21	7,8 ± 0,19	78 ± 1,9	10,6 ± 0,4	4
	Isotype Ctrl.	8,43 ± 0,96	0,515 ±	5,18 ± 0,24	6,45 ± 0,94	64,5 ± 9,4	14,7 ± 2,5	2

Фиг. 17

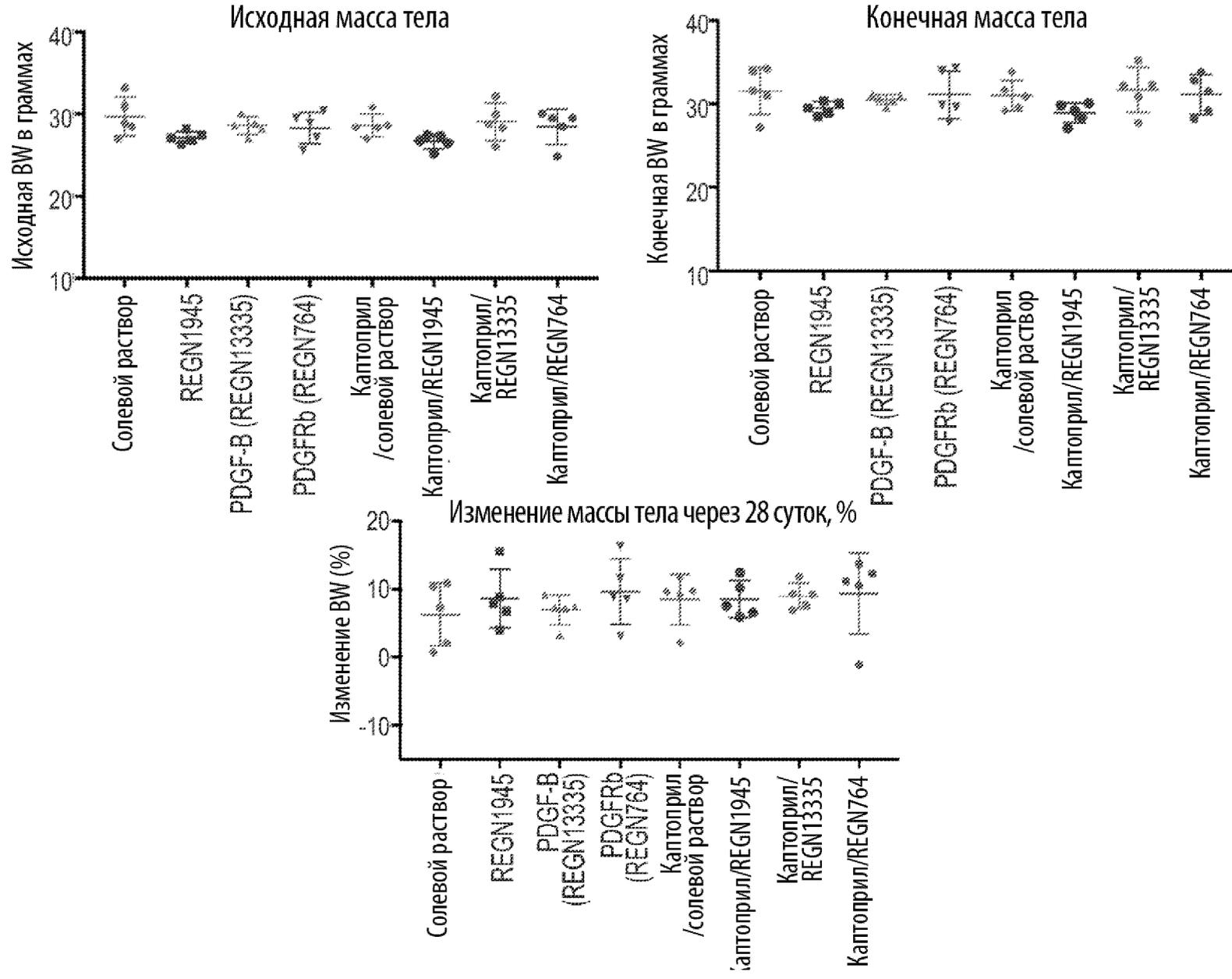
- |  |   |
|--|---|
| 1. Солевой раствор (без Ab, без каптоприла) + EB 25 мг/кг 30 мин   | n=5 (исходный уровень, наивные, отр. контроль)        |
| 2. Солевой раствор (без Ab, каптоприл 5 мг/кг i.p.) + EB 25 мг/кг 30 мин   | n=5 (наивные, пол. контроль)                          |
| 3. Солевой раствор (Ab в качестве изот. контроля REGN1945 25 мг/кг 2X еженедельно 28 суток) + EB 25 мг/кг 30 мин                         | n=5 (исходный уровень, IgG в качестве изот. контроля) |
| 4. Солевой раствор (антитело к PDGFRb REGN764 25 мг/кг 2X еженедельно 28 суток) + EB 25 мг/кг 30 мин                                     | n=5 (исходный уровень, PDGFRb Rx, контроль)           |
| 5. Солевой раствор (антитело к PDGF-B REGN13335 25 мг/кг 2X еженедельно 28 суток) + EB 25 мг/кг 30 мин                                   | n=5 (исходный уровень, PDGF-B Rx, контроль)           |
| 6. Солевой раствор (Ab в качестве изот. контроля REGN1945 25 мг/кг 2X еженедельно 28 суток, каптоприл 5 мг/кг i.p.) + EB 25 мг/кг 30 мин | n=5 (индуцированные/IgG в качестве изот. контроля)    |
| 7. Солевой раствор (антитело к PDGFRb REGN764 25 мг/кг 2X еженедельно 28 суток, каптоприл 5 мг/кг i.p.) + EB 25 мг/кг 30 мин             | n=5 (индуцированные/PDGFRb Rx, контроль)              |
| 8. Солевой раствор (антитело к PDGF-B REGN13335 25 мг/кг 2X еженедельно 28 суток, каптоприл 5 мг/кг i.p.) + EB 25 мг/кг 30 мин           | n=5 (индуцированные/PDGF-B Rx, контроль)              |

**Первичные конечные точки:**

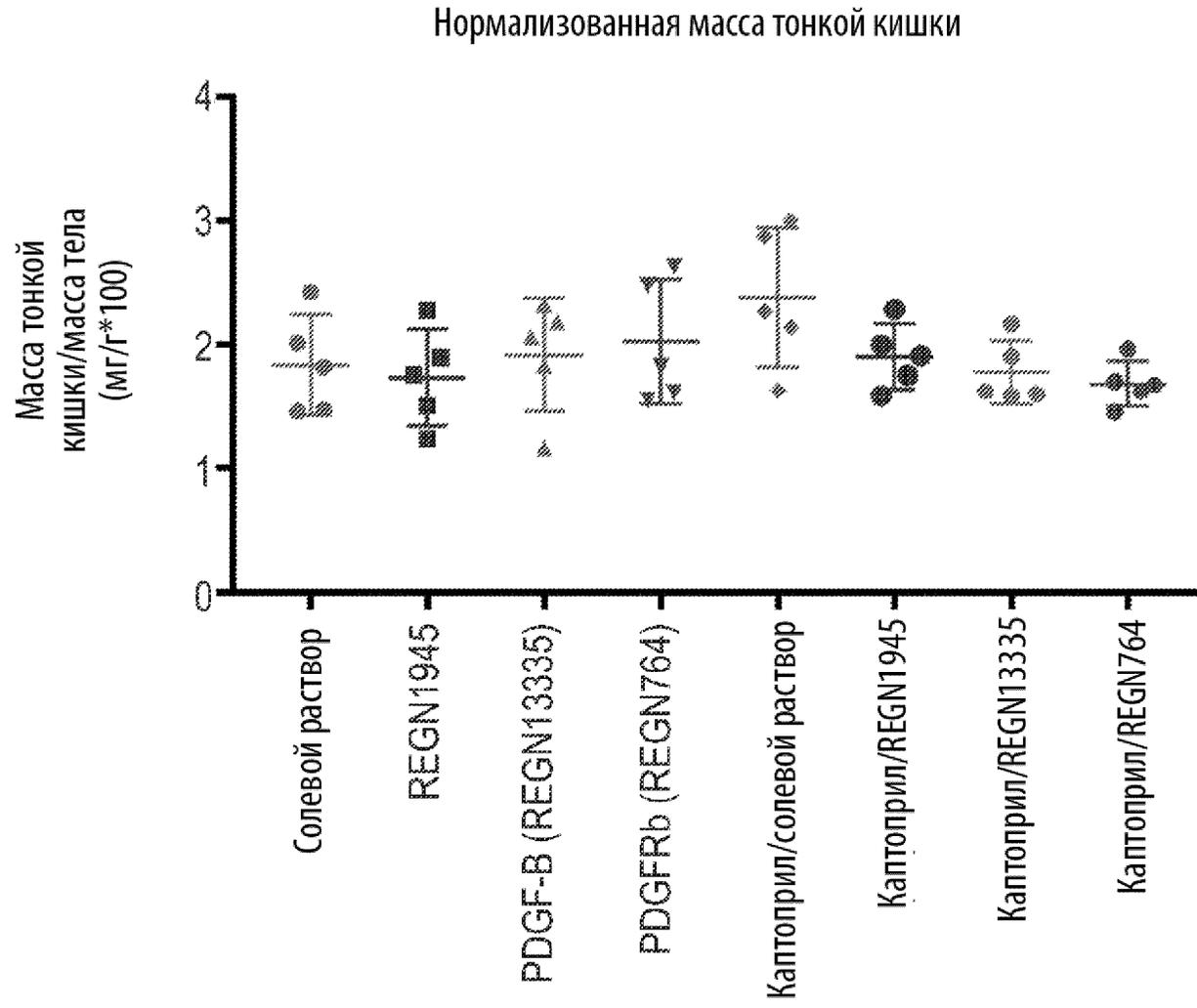
- Масса желудка
- Масса тонкой кишки
- Масса легкого
- Масса головного мозга
- Содержание красителя EB в желудке
- Содержание красителя EB в тонкой кишке
- Содержание красителя EB в легком
- Содержание красителя EB в головном мозге

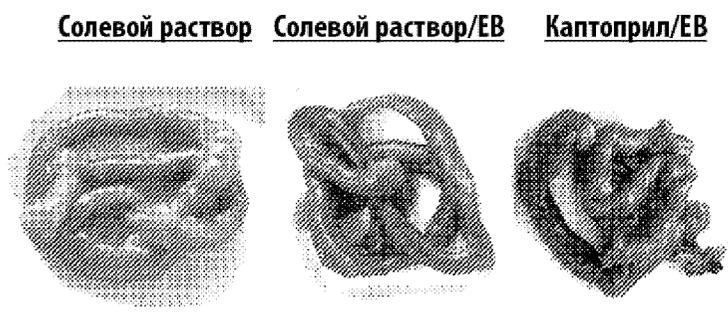
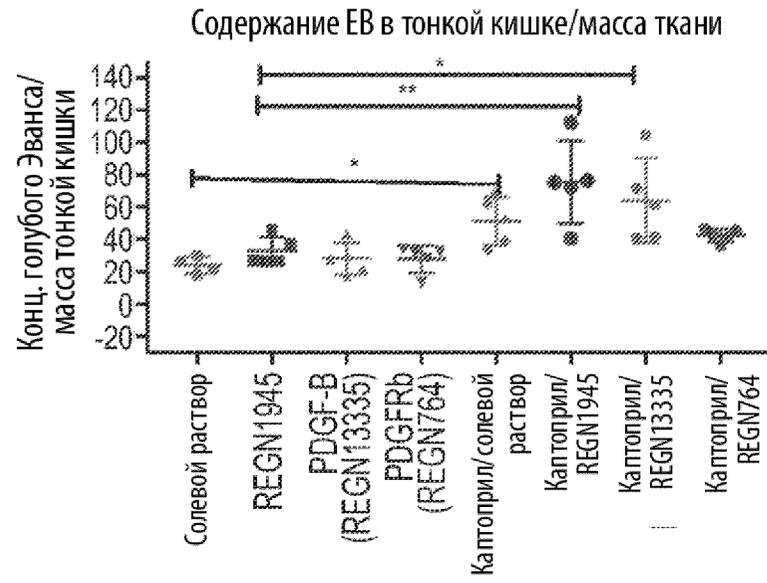
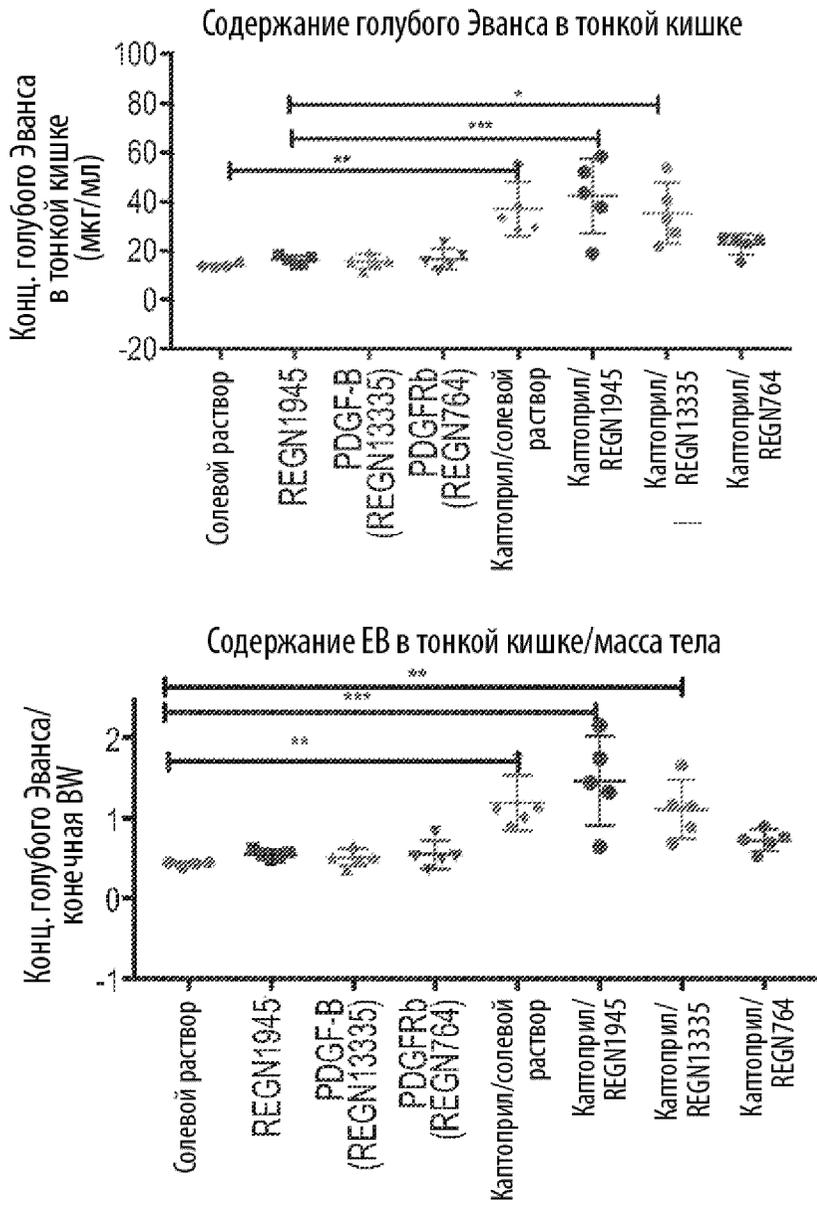


Фиг. 18



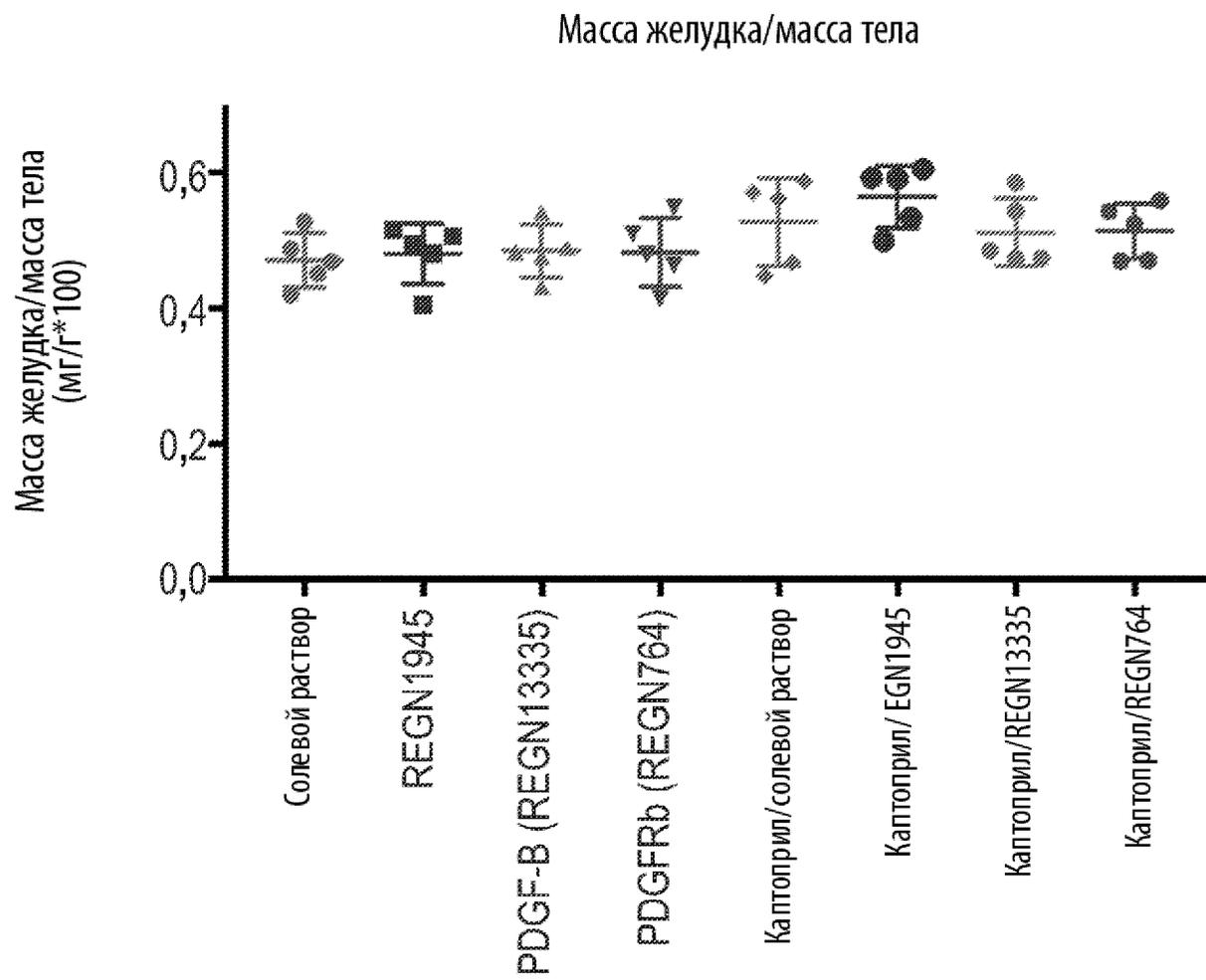
Фиг. 19

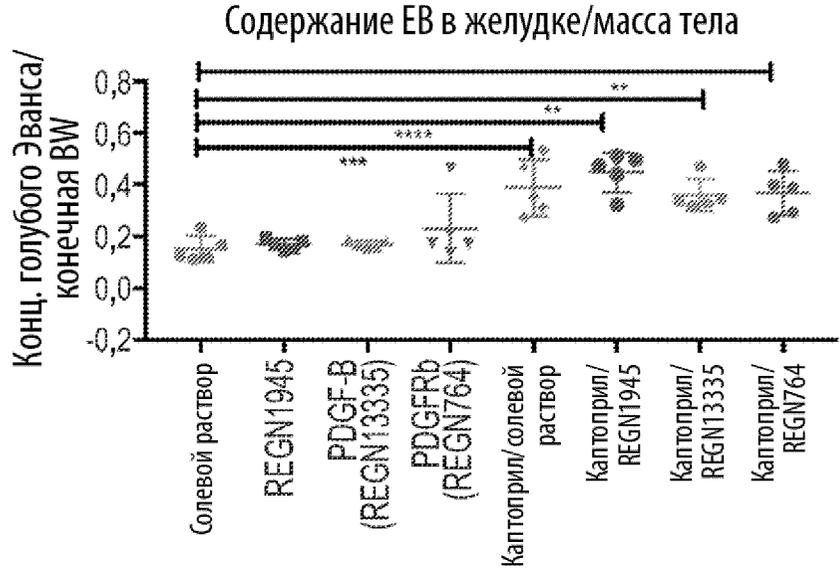
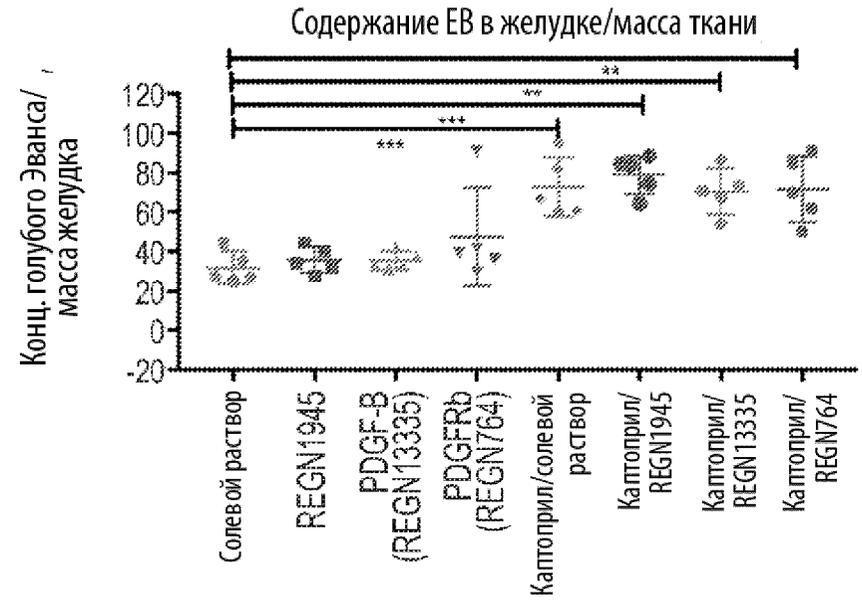
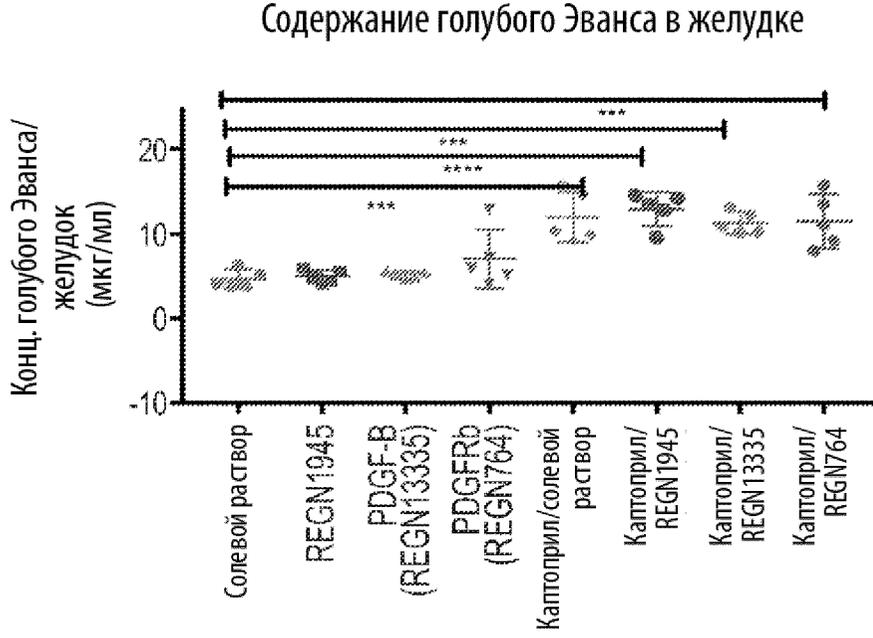




Фиг. 20

Фиг. 21



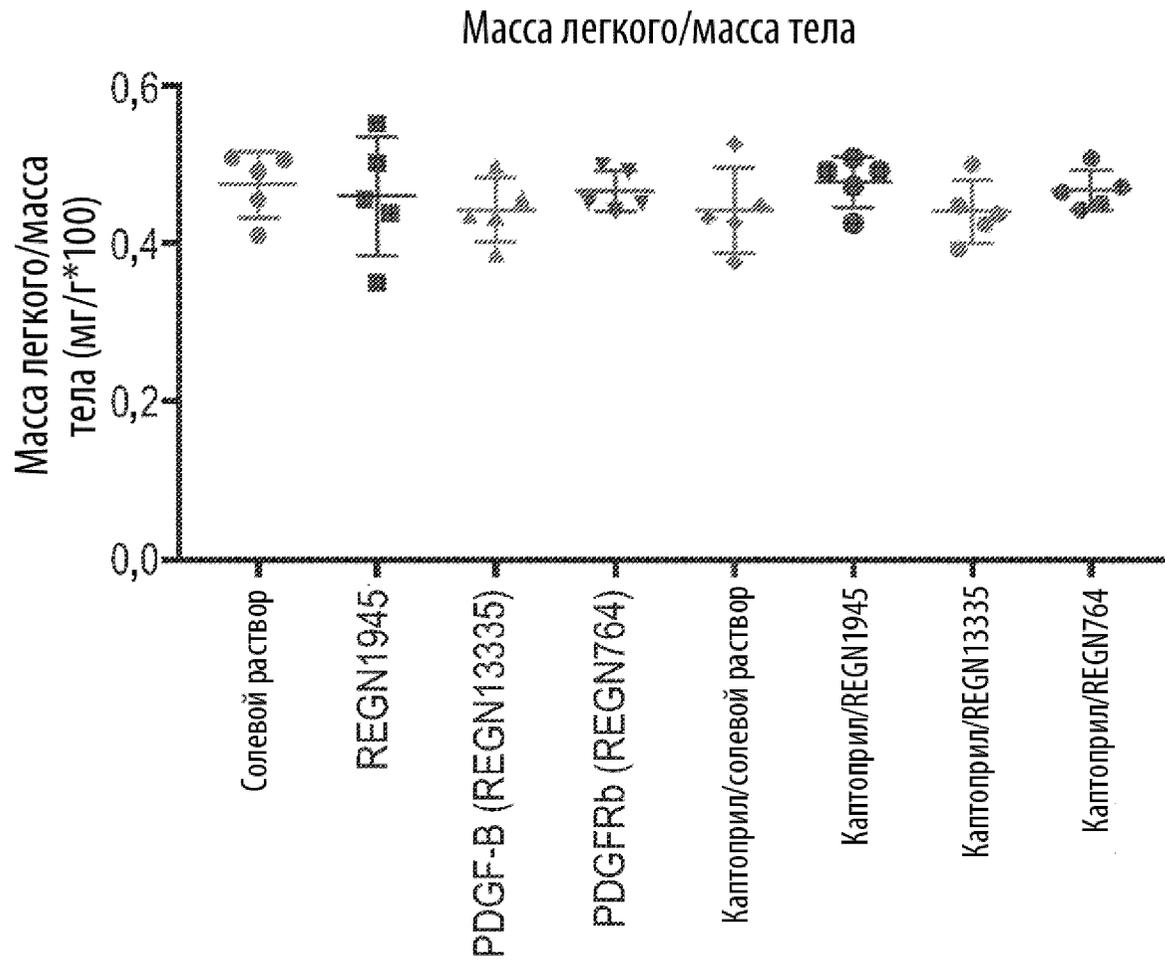


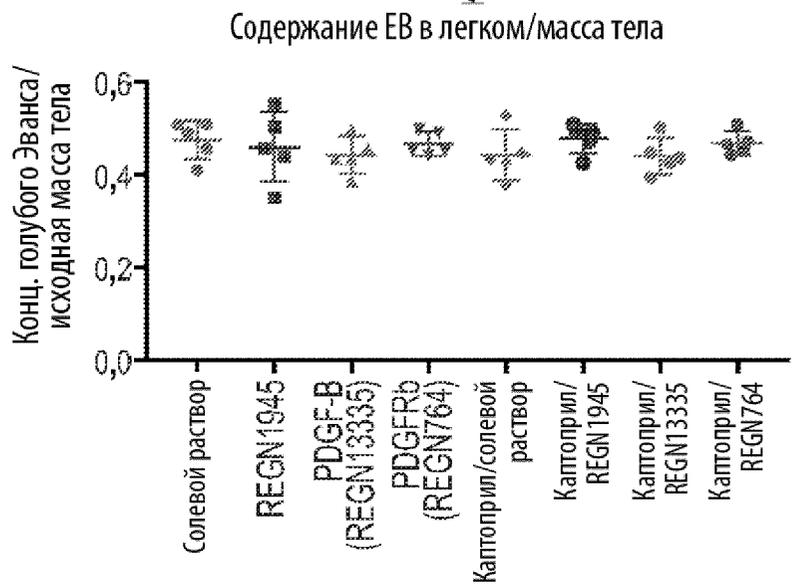
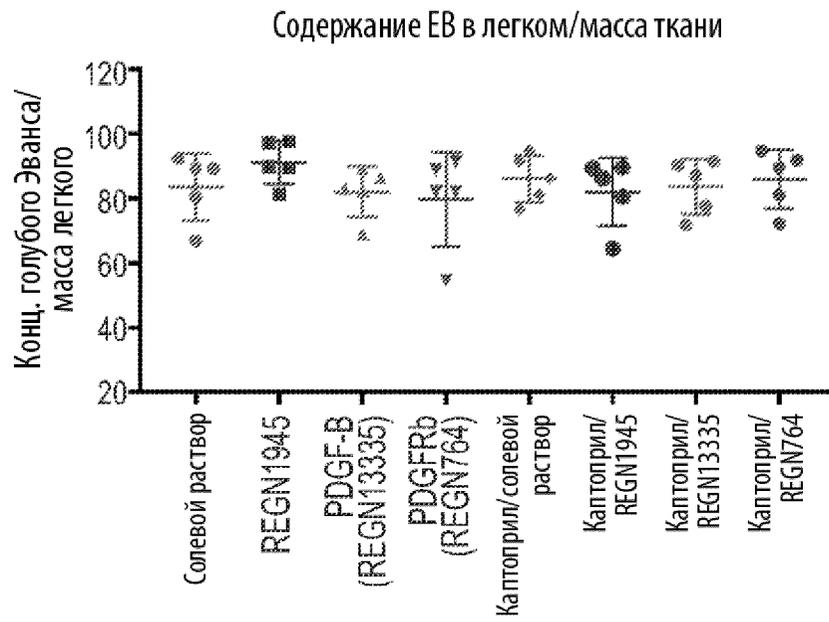
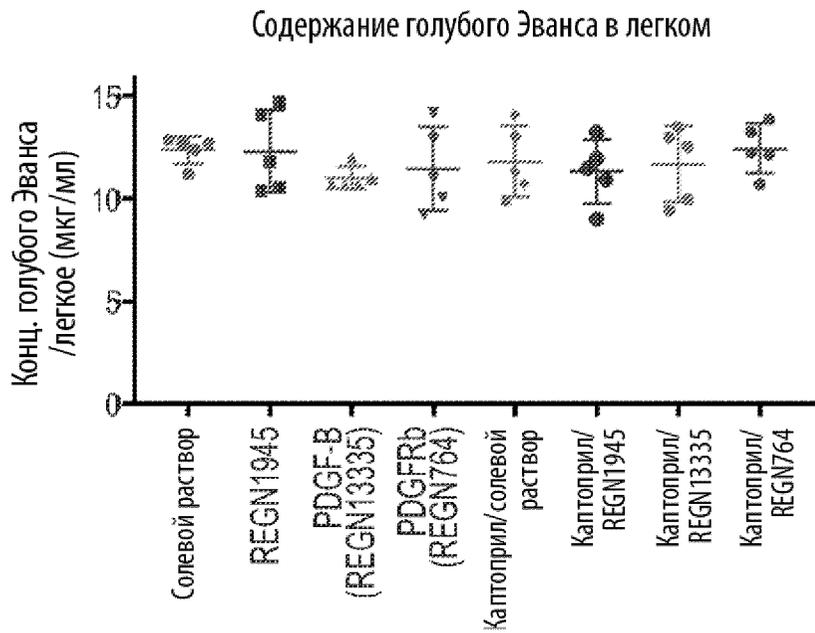
**Солевой раствор    Солевой раствор/EB    Каптоприл/EB**



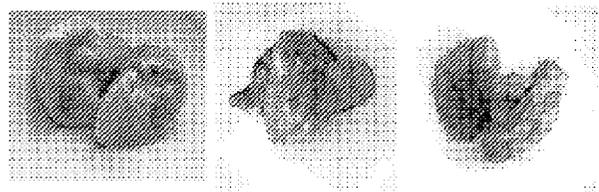
Фиг. 22

Фиг. 23



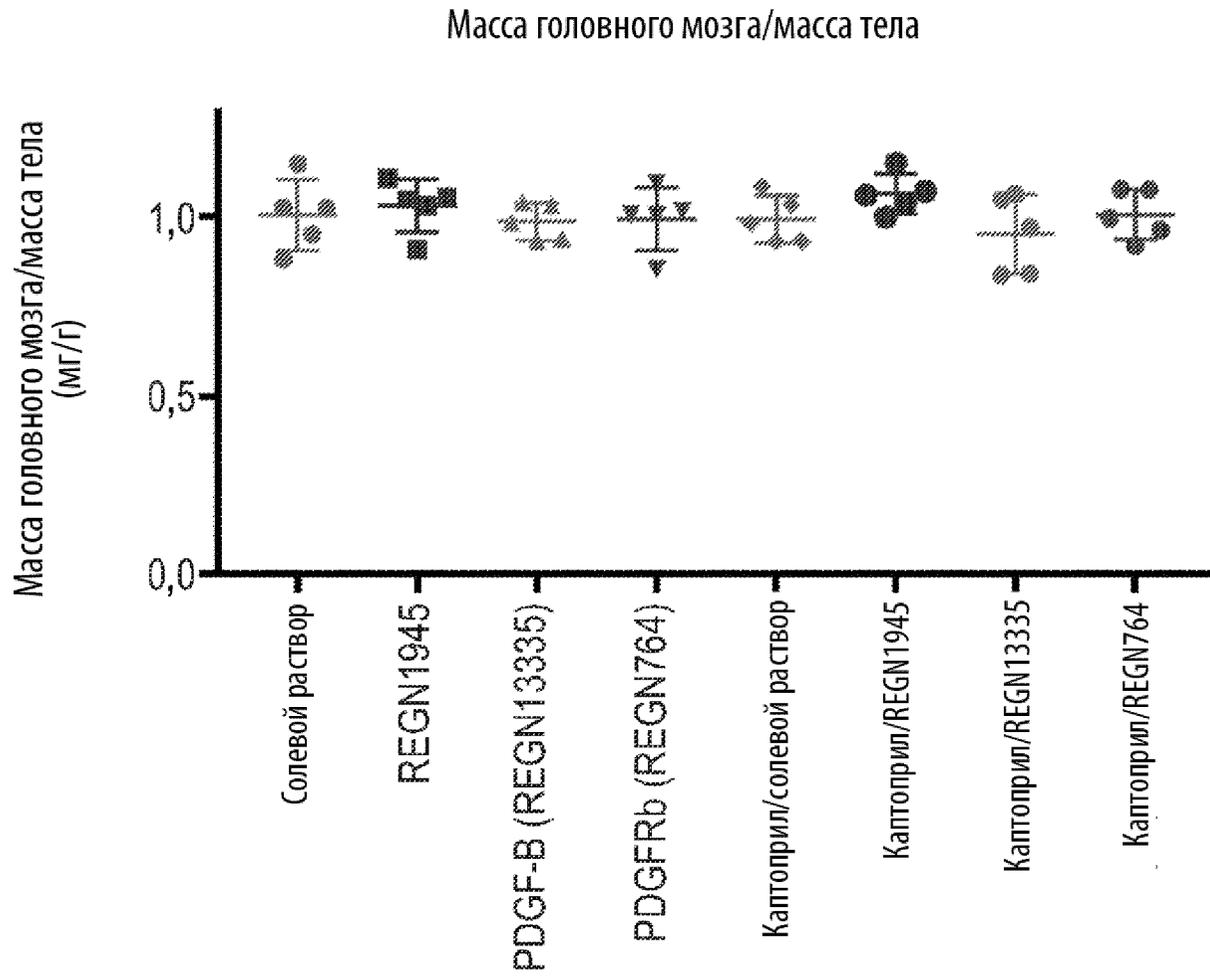


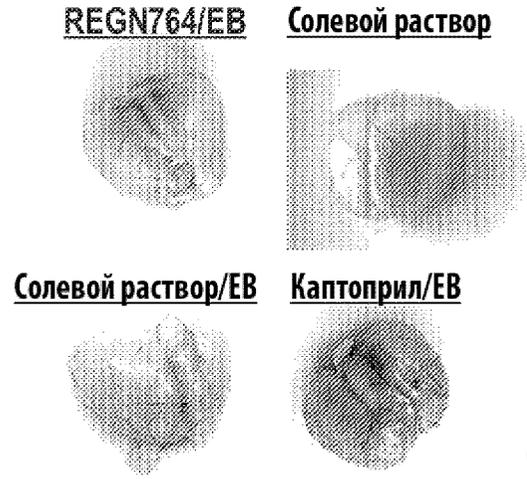
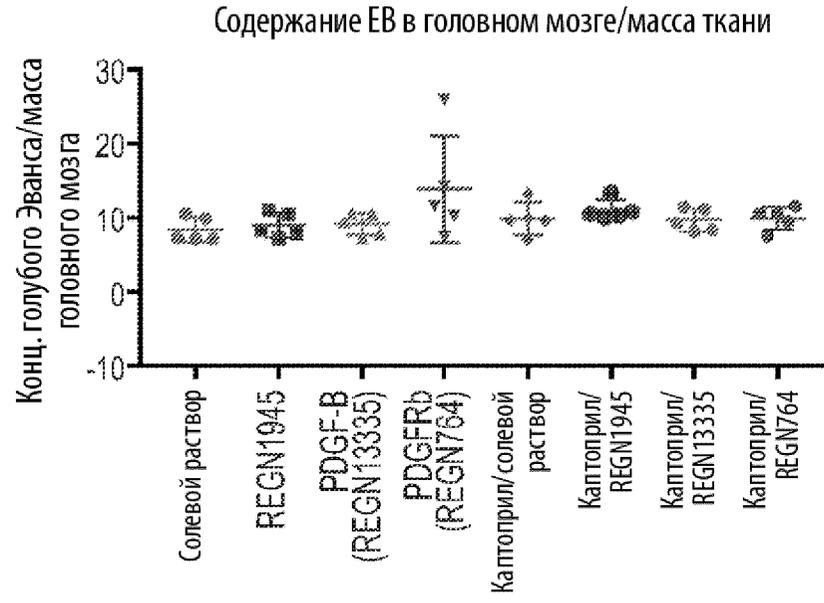
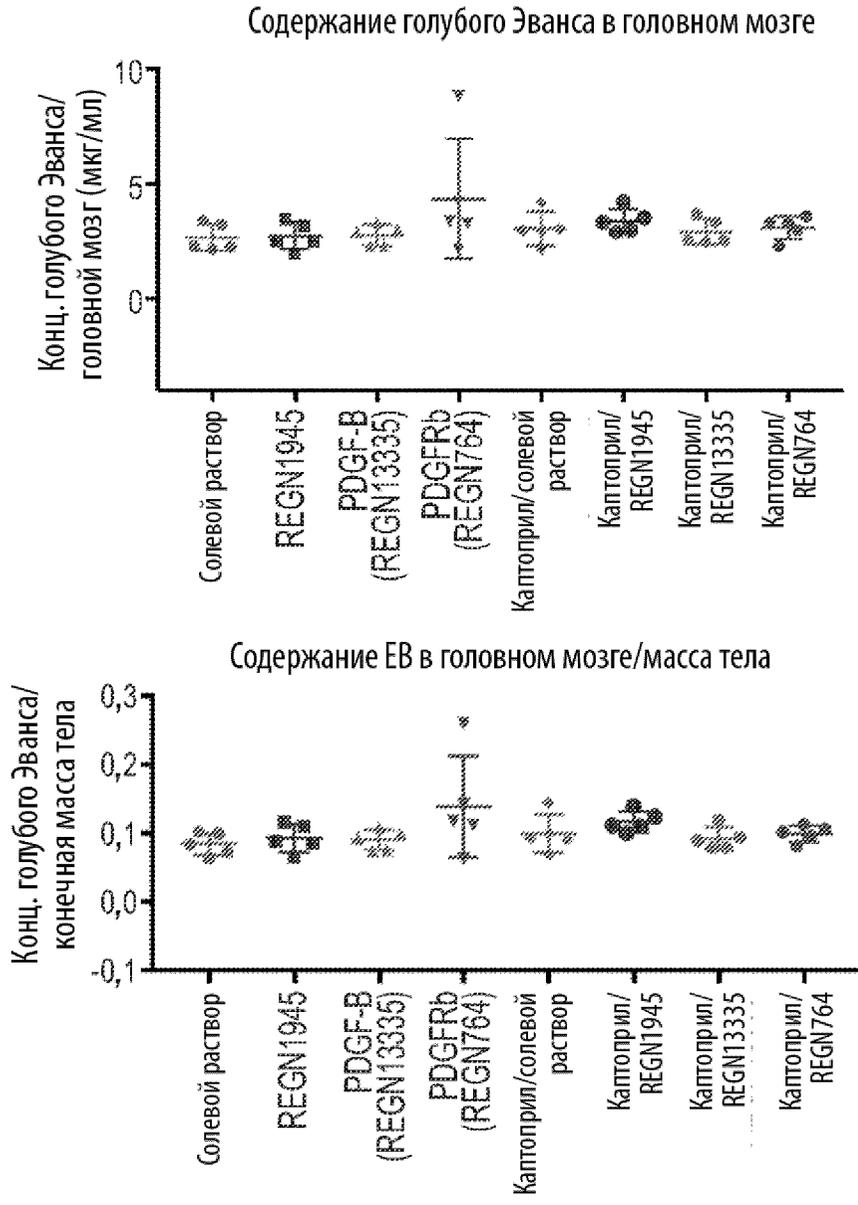
**Солевой раствор    Солевой раствор/EB    Каптоприл/EB**



Фиг. 24

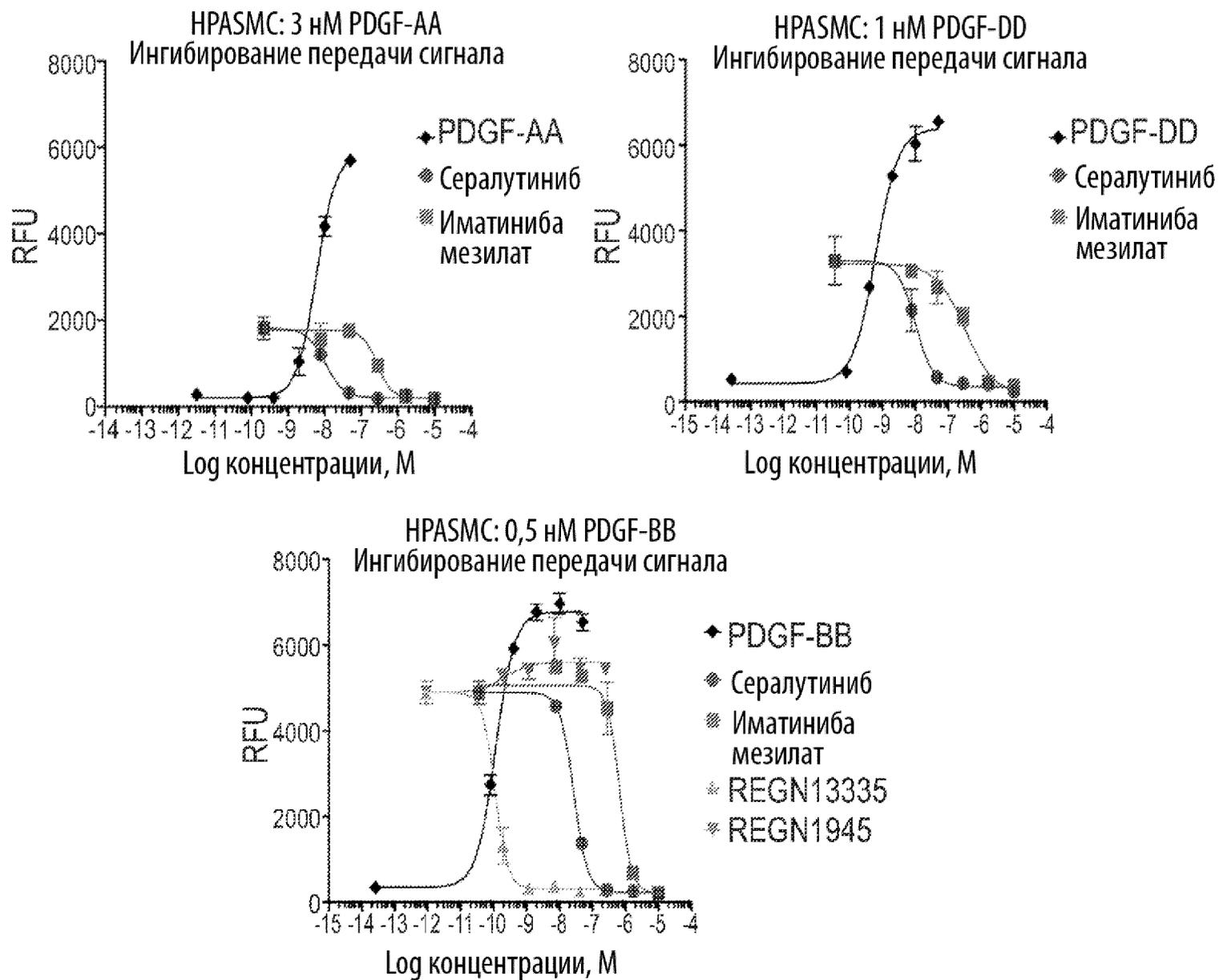
Фиг. 25



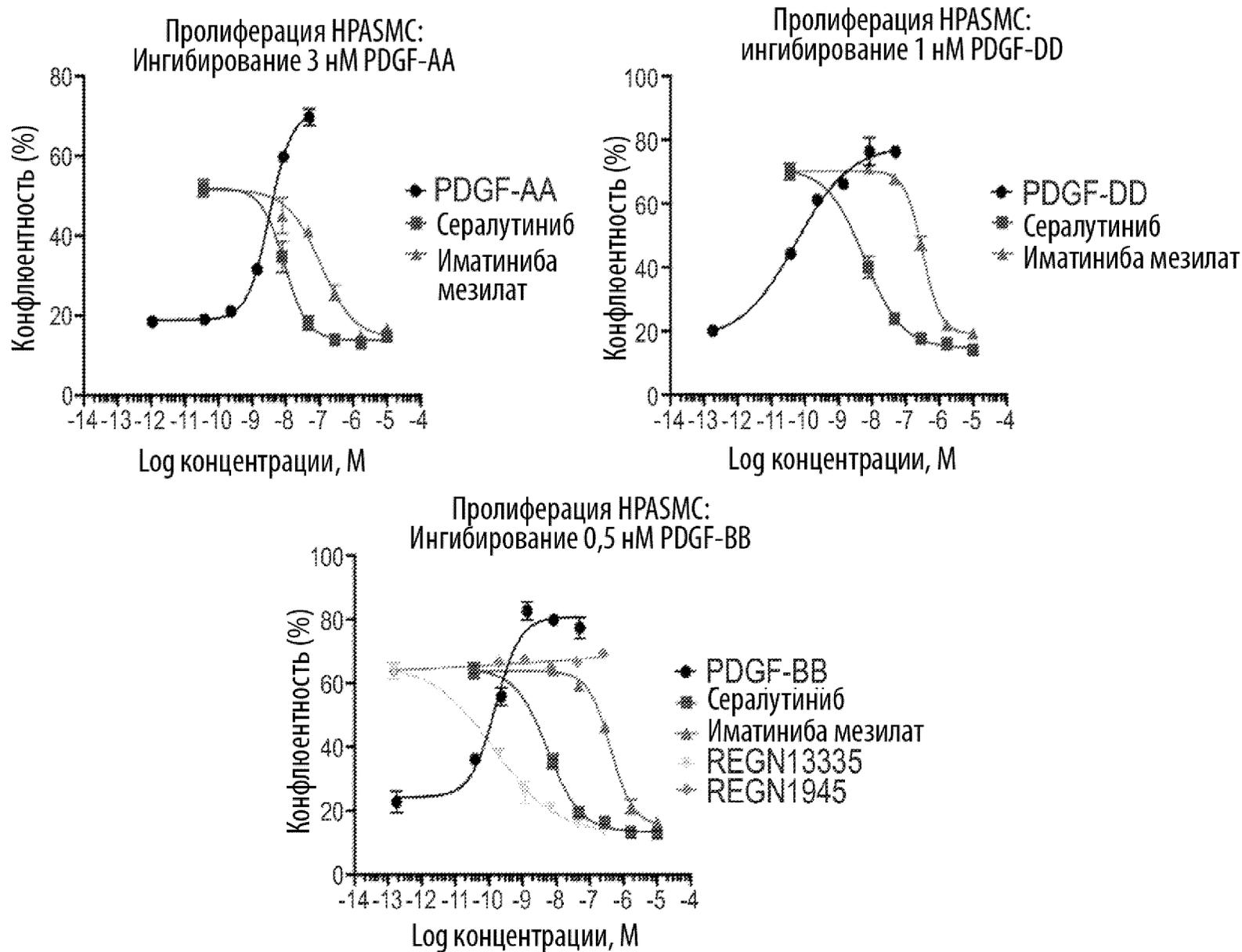


Фиг. 26

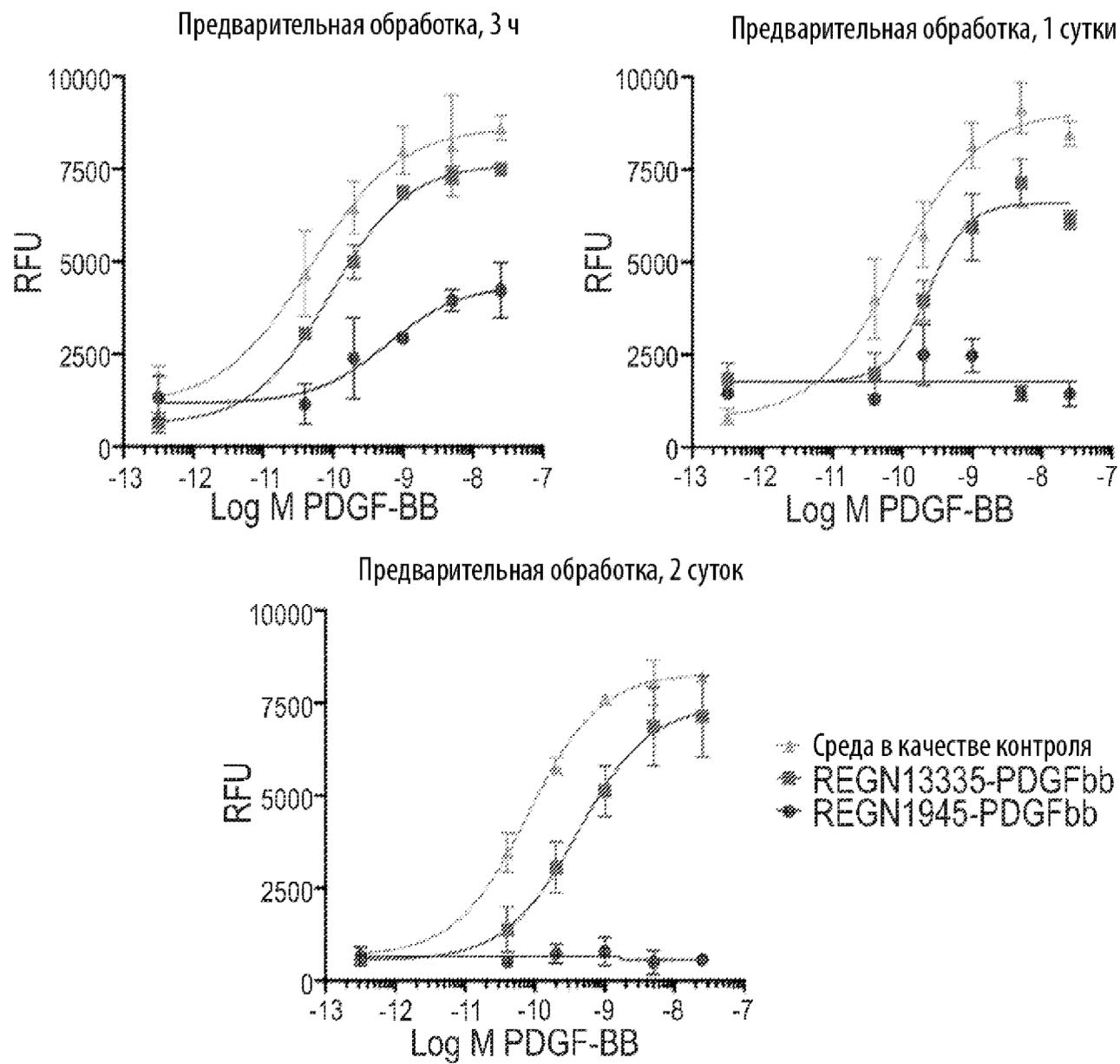
Фиг. 27



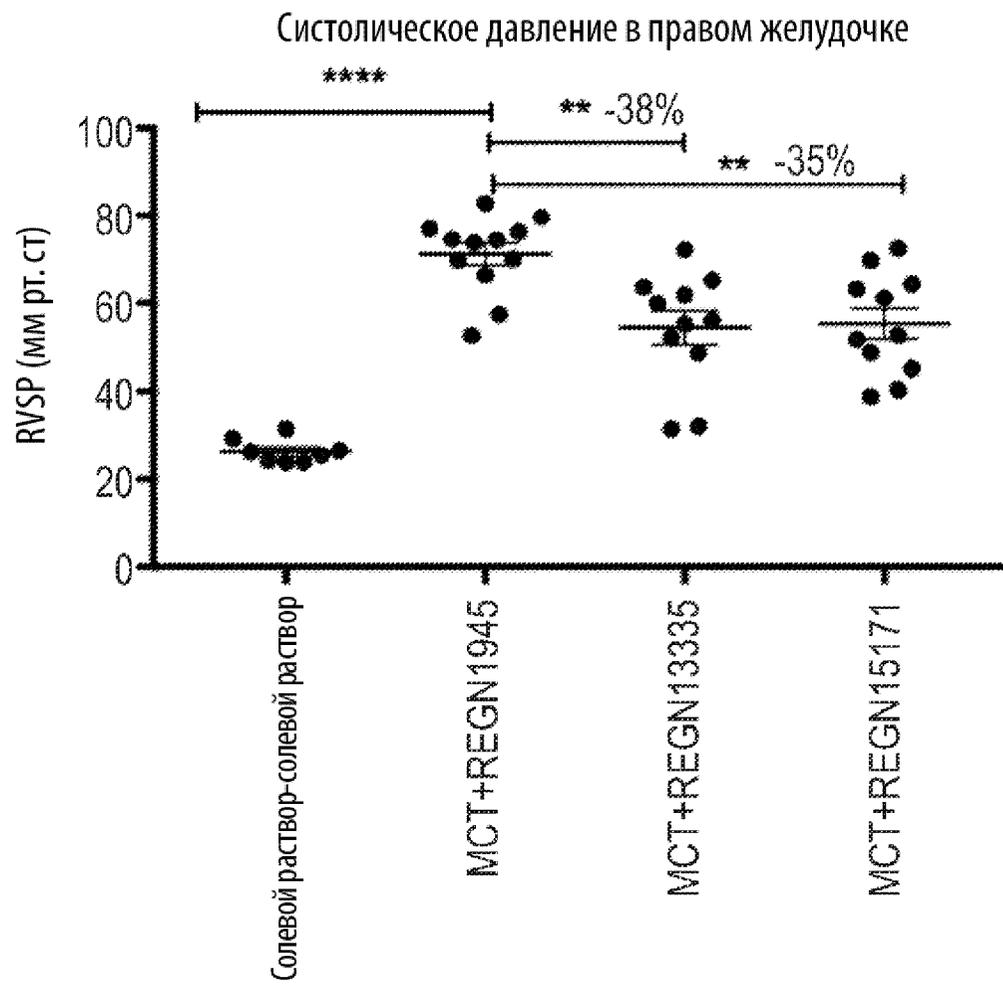
Фиг. 28



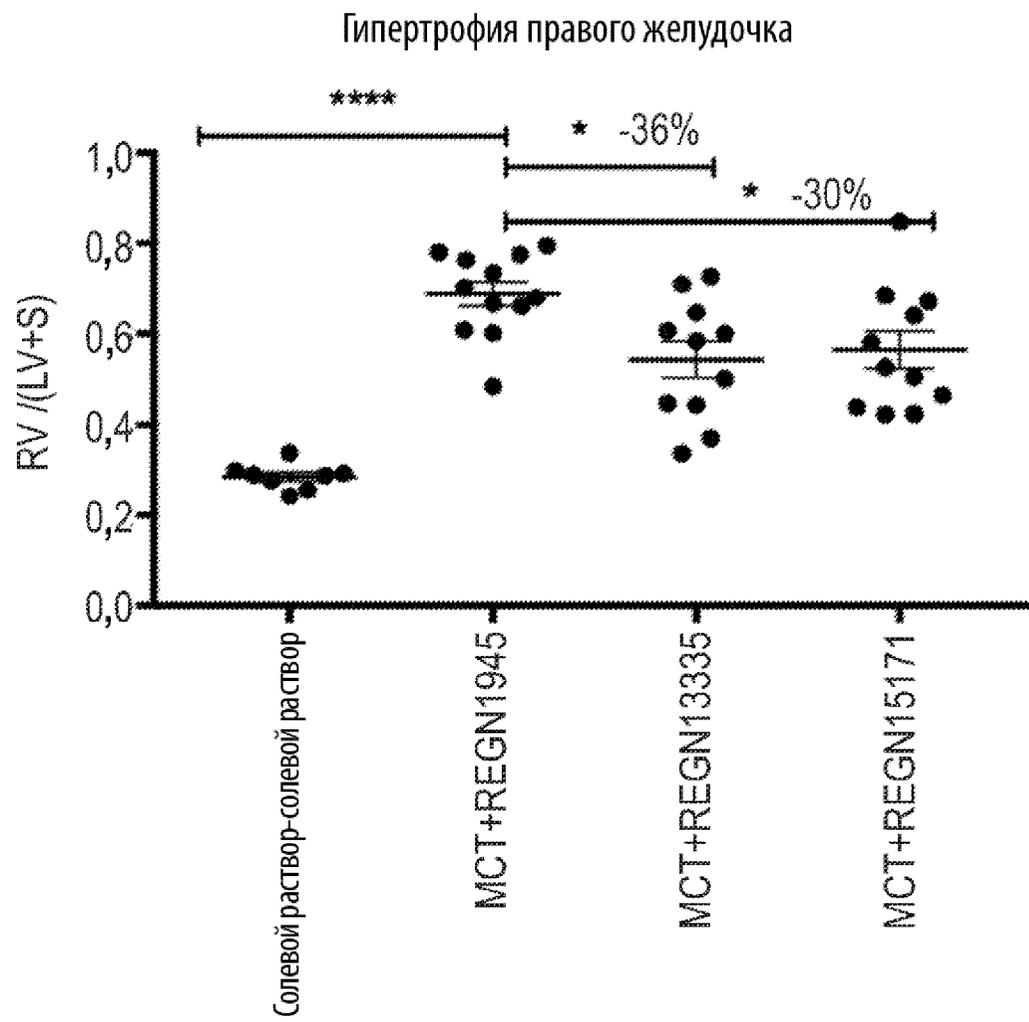
Фиг. 29



Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32

