



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129264** (13) **C2**
(51) МПК

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2021 04073</p> <p>(22) Дата подання заявки: 20.12.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 06.03.2025</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 18215023.5</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 21.12.2018</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву: EP</p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: 08.12.2021, Бюл.№ 49</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 05.03.2025, Бюл.№ 10</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2019/086529, 20.12.2019</p>	<p>(72) Винахідник(и): Бекманн Роланд (DE), Бенц Йорг (CH), Денгль Штефан (DE), Гаснер Крістіан (DE), Хартманн Гуідо (CH), Хюльсманн Петер Міхаель (DE), Імхоф-Юнг Забіне (DE), Ензен Крістіан Хобольт (DE), Кеттенбергер Губерт (DE), Лоренц Штефан (DE), Мьоллскен Йорг (DE), Мундігль Олаф (DE)</p> <p>(73) Володілець (володільці): Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland (CH)</p> <p>(74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2012163520 A1, 06.12.2012 WO 2016075034 A1, 19.05.2016</p>
--	--

(54) АНТИТІЛО, ЯКЕ ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З VEGF ТА IL-1 БЕТА, І СПОСОБИ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіл до VEGF/IL-1 бета та способів їх застосування.

UA 129264 C2

ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

Цей винахід стосується антитіл до VEGF/IL-1бета та способів їх застосування.

ПЕРЕДУМОВИ ДО СТВОРЕННЯ ВИНАХОДУ

5 Про біспецифічне антитіло, яке зв'язується з IL-1бета та VEGF, повідомлялося раніше, і воно пропонувалося для лікування судинних захворювань очей (WO2016/075034, антитіло "0032"). Біспецифічне антитіло 0032 до VEGF/IL-1бета являє собою повнорозмірне подібне до IgG антитіло з обміном доменами VH/VL в одному зв'язувальному плечі (WO2009/080252, Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-11191), причому зв'язувальне плече розташування доменів антитіла дикого типу специфічно зв'язується з IL-1бета, і зв'язувальне плече, яке містить кросинговер доменів VH/VL, специфічно зв'язується з VEGF. VEGF-зв'язувальне плече 10 містить домени VH та VL антитіла до VEGF ранібізумабу.

Мультиспецифічні антитіла, які містять два паратопа в одній парі варіабельного домену важкого ланцюга (VH) і варіабельного домену легкого ланцюга (VL), були описані в WO2008/027236; WO2010/108127 і Bostrom, J., et al., Science 323 (2009) 1610-1614, а також у 15 WO2012/163520.

В WO2012/163520 розкриті біспецифічні антитіла, які містять два паратопа, що не перекриваються, в одній парі доменів VH і VL ("DutaFabs"). Кожен паратоп біспецифічного антитіла з WO2012/163520 містить амінокислоти з CDR важкого ланцюга та з легкого ланцюга, причому CDR-H1 та CDR-H3 важкого ланцюга, а також CDR-L2 легкого ланцюга забезпечують 20 перший паратоп, а CDR-L1 та CDR-L3 легкого ланцюга, а також CDR-H2 важкого ланцюга забезпечують другий паратоп. Моноспецифічні антитіла, які містять окремі паратопа, виділені незалежно з різних Fab-бібліотек, які варіюють або в першому, або у другому паратопі. Амінокислотні послідовності вказаних моноспецифічних антитіл визначені та об'єднані в біпаратопній парі VH та VL. Один типовий Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з VEGF та IL-6, розкритий в WO2012/163520.

Існує потреба у покращених терапевтичних антитілах, які зв'язуються з VEGF та IL-1бета.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Цей винахід стосується біспецифічних антитіл до VEGF/IL-1бета і способів їх застосування.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з 30 IL-1бета людини, яке містить паратоп VEGF та паратоп IL-1бета в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) та варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому паратоп VEGF містить амінокислотні залишки з CDR-H2, CDR-L1 та CDR-L3 антитіла, причому паратоп IL-1бета містить амінокислотні залишки з CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2 антитіла.

35 В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить паратоп VEGF та паратоп IL-1бета в одній спорідненій парі домену VL та домену VH, причому пара варіабельного домену легкого ланцюга та варіабельного домену важкого ланцюга одночасно зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить паратоп VEGF та паратоп IL-1бета в одній спорідненій парі домену 40 VL та домену VH, причому жодна з амінокислот, які містяться в паратопі VEGF, не міститься в паратопі IL-1бета.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить паратоп VEGF та паратоп IL-1бета в одній спорідненій парі домену 45 VL та домену VH, причому антитіло зв'язується з тим же епітопом на VEGF людини та з тим же епітопом на IL-1бета людини, що й антитіло з варіабельним доменом важкого ланцюга SEQ ID NO:11 та варіабельним доменом легкого ланцюга SEQ ID NO:12.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF121 людини з K_D менш ніж 10 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, та (ii) з IL-1бета людини з K_D менш ніж 30 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку 55 агрегації більше ніж 70 °C.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіяння світла.

60 В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому зв'язування Fab-фрагмента антитіла з VEGF людини інгібує

зв'язування VEGF з VEGFR2 з IC50 менш ніж 50 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу; і причому зв'язування Fab-фрагмента антитіла з IL-1бета людини інгібує зв'язування IL-1бета з IL-1бетаR1 з IC50 менш ніж 30 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

5 В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.

10 В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

15 В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить домен VH, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 та D101, та домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 та Y96, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом. В одному варіанті реалізації антитіло містить паратоп VEGF, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66 та R83, та наступні амінокислотні залишки в домені VL: I2, Y27, W27a, S27c, S27d, E67, D68, Q69, R92, Y93, H94 та Y96; та паратоп IL-1бета, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, K94, D95, V96, F98 та D101, та наступні амінокислотні залишки в домені VL: L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, Y91.

20 В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить домен VH, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 та D101, та домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, S67, H68, E69, Y91, R92, Y93, H94 та Y96, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом. В одному варіанті реалізації антитіло містить паратоп VEGF, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66 та R83, та наступні амінокислотні залишки в домені VL: I2, Y27, W27a, S27c, S27d, S67, H68, E69, R92, Y93, H94 та Y96; та паратоп IL-1бета, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, K94, D95, V96, F98 та D101, та наступні амінокислотні залишки в домені VL: L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, Y91.

25 В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12.

30 В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з

амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12.

5 В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка
10 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11, причому домен VH містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, R66, R83 та K94; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12, причому домен VL містить амінокислотні залишки I2, Y49, G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка
20 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 з до 15 амінокислотних замінів; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 з до 15 амінокислотних замінів. В одному варіанті реалізації антитіло містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 з до 15 амінокислотних замінів, причому амінокислотні заміни розташовані в положеннях 3-25, 36-49, 97-82с, 84-93 або 103-113 SEQ ID NO:11; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 з до 15 амінокислотних замінів, причому амінокислотні заміни розташовані в положеннях 1, 4, 6, 8-23, 35-48, 58-66, 70-88 або 98-107 SEQ ID NO:12, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка
50 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 з до 15 амінокислотних замінів; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 з до 15 амінокислотних замінів.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка
60

містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, і яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 з до 15 амінокислотних замін; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 з до 15 амінокислотних замін.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить послідовність VH з SEQ ID NO:11 та послідовність VL з SEQ ID NO:12.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга з SEQ ID NO:20 та амінокислотну послідовність легкого ланцюга з SEQ ID NO:19.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга з SEQ ID NO:18 та амінокислотну послідовність легкого ланцюга з SEQ ID NO:19.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF121 людини з K_D менше 10 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, та (ii) з IL-1бета людини з K_D менш ніж 30 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12; причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF121 людини з K_D менше 10 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, та (ii) з IL-1бета людини з K_D менш ніж 30 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12; причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації більше ніж 70 °C.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить

амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та (домен VL), який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12; причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіяння світла.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12; та причому зв'язування Fab-фрагмента антитіла з IL-1бета людини інгібує зв'язування IL-1бета з IL-1бетаR1 з IC50 менш ніж 30 nM, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

Один варіант реалізації даного винаходу стосується фрагмента антитіла, який зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини. Один варіант реалізації даного винаходу стосується фрагмента біспецифічного антитіла, який зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини. В одному варіанті реалізації фрагмент антитіла вибраний з Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ або односторонніх антитіл, одержаних з них. Один варіант реалізації даного винаходу стосується Fab-фрагмента, який зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини. Один варіант реалізації даного винаходу стосується Fv-фрагмента, який зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини.

Один варіант реалізації даного винаходу стосується повнорозмірного антитіла IgG, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини.

В одному аспекті цей винахід забезпечує виділену нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло даного винаходу.

В одному аспекті цей винахід забезпечує клітину-хазяїна, яка містить нуклеїнову кислоту даного винаходу.

В одному аспекті цей винахід забезпечує експресійний вектор, який містить нуклеїнову кислоту даного винаходу.

В одному аспекті цей винахід забезпечує спосіб одержання антитіла, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, який включає культивування клітини-хазяїна даного винаходу так, щоб одержати антитіло.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, одержане способом даного винаходу.

В одному аспекті цей винахід забезпечує фармацевтичний препарат, який містить антитіло даного винаходу та фармацевтично прийнятний носій.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло даного винаходу для застосування як лікарського засобу, в одному варіанті реалізації для застосування в лікуванні судинного захворювання.

В одному аспекті цей винахід забезпечує застосування антитіла даного винаходу або фармацевтичної композиції даного винаходу у виготовленні лікарського засобу, в одному варіанті реалізації лікарського засобу для лікування судинного захворювання.

В одному аспекті цей винахід забезпечує спосіб лікування індивідууму, який має судинне захворювання, який включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла даного винаходу або фармацевтичної композиції даного винаходу.

В одному аспекті цей винахід забезпечує спосіб інгібування ангиогенезу у індивідууму, який включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла даного винаходу або фармацевтичної композиції даного винаходу для інгібування ангиогенезу.

Згідно з даним винаходом забезпечується терапевтичне антитіло до VEGF/IL-1бета, яке здатне зв'язуватися з його цільовими антигенами одночасно, навіть коли забезпечується у вигляді біспецифічного Fab-фрагмента. Крім того, антитіло даного винаходу забезпечує

декілька цінних властивостей, які дозволяють його терапевтичне застосування, таких як висока афінність, гідрофільність та висока стабільність. Антитіло даного винаходу може забезпечуватися в рідких препаратах з високими концентраціями з в'язкістю, придатною для застосування для очей. Антитіло даного винаходу підходить для лікування судинних захворювань очей.

СТИСЛИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фігура 1: Схематичне зображення Fab-фрагмента антитіла до VEGF/IL-1бета даного винаходу. Показаний вид зверху вниз спорідненої пари VH/VL, який включає розташування амінокислоти CDR (верхнє зображення). Домен VH показаний сірим, домен VL показаний білим. Крім того, вказаним є просторове розташування ділянок CDR. Ділянки паратопу антитіла даного винаходу виділені (нижнє зображення), причому паратоп VEGF розташований в ділянках H-CDR2, L-CDR1 та L-CDR2, а паратоп IL-1бета розташований в ділянках H-CDR1, H-CDR3 та L-CDR2.

Фігура 2: Амінокислотні послідовності доменів VH типових антитіл до VEGF/IL-1бета даного винаходу. Вказана нумерація за Кабатом положення амінокислот, а також ділянок CDR та FR. Виділені положення амінокислот, які роблять внесок у паратоп VEGF, а також паратоп IL-1бета, як визначено у прикладі 8.

Фігура 3: Амінокислотні послідовності доменів VL типових антитіл до VEGF/IL-1бета даного винаходу. Вказана нумерація за Кабатом положення амінокислот, а також ділянок CDR та FR. Виділені положення амінокислот, які роблять внесок у паратоп VEGF, а також паратоп IL-1бета, як визначено у прикладі 8.

Фігура 4: Одночасне зв'язування антигенів антитіла 1HVL12.85 до VEGF/IL-1бета з VEGF та IL-1бета, як оцінено за допомогою ППР згідно з прикладом 5.

Фігура 5: Одночасне зв'язування антигенів антитіла RO7200394 до VEGF/IL-1бета з VEGF та IL-1бета, як оцінено за допомогою ППР згідно з прикладом 5.

Фігура 6: Одночасне зв'язування антигенів антитіла 0032 до VEGF/IL-1бета рівня техніки з VEGF та IL-1бета, як оцінено за допомогою ППР згідно з прикладом 5.

Фігура 7A: Інгібування зв'язування VEGF з hVEGFR2 у присутності антитіла RO7200394 (Fab-фрагмента), як оцінено у прикладі 6. Інгібування зв'язування з рецептором оцінювали у присутності та за відсутності іншого антигену-мішені біспецифічного антитіла, IL-1бета.

Фігура 7B: Інгібування зв'язування VEGF з hVEGFR2 у присутності антитіла 0032 рівня техніки (повнорозмірного IgG), як оцінено у прикладі 6. Інгібування зв'язування з рецептором оцінювали у присутності та за відсутності іншого антигену-мішені біспецифічного антитіла, IL-1бета.

Фігура 8A: Інгібування зв'язування IL-1бета з IL-1бетаR1 у присутності антитіла RO7200394 (Fab-фрагмента), як оцінено у прикладі 6. Інгібування зв'язування з рецептором оцінювали у присутності та за відсутності іншого антигену-мішені біспецифічного антитіла, VEGF.

Фігура 8B: Інгібування зв'язування IL-1бета з IL-1бетаR1 у присутності антитіла 0032 рівня техніки (повнорозмірного IgG), як оцінено у прикладі 6. Інгібування зв'язування з рецептором оцінювали у присутності та за відсутності іншого антигену-мішені біспецифічного антитіла, VEGF.

Фігура 9: Конкурентний ІФА, який оцінює VEGF121-зв'язування з VEGF-R1 у присутності вказаних антитіл, як оцінено у прикладі 6.

Фігура 10: Конкурентний ІФА, який оцінює VEGF165-зв'язування з VEGF-R1 у присутності вказаних антитіл, як оцінено у прикладі 6.

Фігура 11: Результати хроматографії гідрофобної взаємодії (ХГВ) антитіла даного винаходу, як оцінено у прикладі 7.

Фігура 12: Результати хроматографії гідрофобної взаємодії (ХГВ) антитіла 0032 рівня техніки (приклад 7).

Фігура 13: В'язкість антитіла 1HVL12.85, як оцінено у прикладі 8.

Фігура 14: В'язкість антитіла RO7200394, як оцінено у прикладі 8.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

1. Визначення

Якщо інше не визначене в даному документі, наукові та технічні терміни, які використовуються разом з даним винаходом, будуть мати значення, які зазвичай розуміють спеціалісти в даній галузі. Крім того, якщо інше не є необхідним за контекстом, терміни в однині будуть включати форми множини, і терміни у множині будуть включати однину. Способи та техніки даного розкриття загалом виконуються згідно зі звичайними способами, добре відомими в даній галузі. Загалом номенклатури, які використовуються разом з, та техніки біохімії, ферментології, молекулярної та клітинної біології, мікробіології, генетики та хімії білків та

нуклеїнових кислот та гібридизації, описані в даному документі, є добре відомими та такими, що зазвичай використовуються в даній галузі.

Якщо інше не визначене в даному документі, термін "який містить" буде включати термін "який складається з".

5 Термін "приблизно" при використанні в даному документі разом з конкретним значенням (наприклад, температурою, концентрацією, часом та іншими) буде стосуватися варіації +/- 1 % конкретного значення, якого стосується термін "приблизно".

Термін "антитіло" в даному документі використовується в найширшому сенсі та включає різні структури антитіл, включаючи, але не обмежуючись ними, моноклональні антитіла, 10 мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) та фрагменти антитіл, за умови, що вони проявляють необхідну антигензв'язувальну активність.

"Виділене" антитіло являє собою антитіло, яке було відокремлено від компонентів його природного оточення. В деяких варіантах реалізації антитіло є очищеним до більш ніж 95 % або 15 99 % чистоти, яка визначається, наприклад, за допомогою електрофорезу (наприклад, ДСН-ПААГ-електрофорез, ізоелектричного фокусування (ІЕФ), капілярного електрофорезу) або методу хроматографії (наприклад, іонообмінної або обернено-фазової ВЕРХ). Огляд способів оцінки чистоти антитіл див., наприклад, в Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

У контексті даного документу термін "моноклональне антитіло" стосується антитіла, одержаного з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, які складають 20 популяцію, є ідентичними та/або зв'язують один і той самий епітоп, за винятком можливих варіантних антитіл, які, наприклад, містять природні мутації або виникають під час одержання препарату моноклональних антитіл, причому такі варіанти в цілому є присутніми в незначних кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які зазвичай містять різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло препарату 25 моноклональних антитіл спрямоване проти однієї детермінанти на антигені. Таким чином, визначення "моноклональний" вказує на характеристику антитіла, як одержаного з по суті гомогенної популяції антитіл, і його не слід інтерпретувати як вимогу одержання антитіла будь-яким конкретним чином.

В даному документі терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" і "повне антитіло" 30 взаємозамінно вживаються в цьому документі для позначення антитіла, що має структуру, значною мірою схожу зі структурою нативного антитіла, або містить важкі ланцюги, які містять Fc-домен, згідно з визначенням в цьому документі.

"Клас" антитіла стосується типу константного домену або константної ділянки, який містить його важкий ланцюг. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, та деякі з них 35 можуть бути додатково розділені на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2. В деяких варіантах реалізації антитіло є антитілом ізотипу IgG1. В деяких варіантах реалізації антитіло є антитілом ізотипу IgG1 з мутацією P329G, L234A та L235A для зниження ефекторної функції Fc-ділянки. В інших варіантах реалізації антитіло є антитілом ізотипу IgG2. В деяких варіантах реалізації антитіло є антитілом ізотипу IgG4 з мутацією S228P у шарнірній 40 ділянці для покращення стабільності антитіла IgG4. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобулінів, називаються α , δ , ϵ , γ , та μ , відповідно. Легкий ланцюг антитіла може бути віднесений до одного з двох типів, які називають каппа (κ) і лямбда (λ), на підставі амінокислотної послідовності його константного домену.

У цьому документі термін "ділянка Fc" використовується для визначення C-кінцевої ділянки 45 важкого ланцюга імуноглобуліну, яка містить щонайменше частину константної ділянки. Цей термін включає Fc-ділянки з нативною послідовністю та варіантні Fc-ділянки. В одному варіанті реалізації Fc-ділянка важкого ланцюга людського IgG простягається від Cys226 або від Pro230 до карбокси-кінця важкого ланцюга. Якщо в цьому документі не зазначено інше, нумерація амінокислотних залишків у Fc-ділянці або константній ділянці відповідає системі нумерації EU, 50 яку також називають індексом EU, як описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Ефекторні функції" стосуються тих біологічних властивостей, притаманних ділянці Fc 55 антитіла, які змінюються зі зміною ізотипу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіл включають: зв'язування C1q та комплементарну цитотоксичність (CDC); зв'язування Fc-рецепторів; антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; пригнічення рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептору); та активацію B-клітин.

Термін "варіабельна ділянка" або "варіабельний домен" стосується домену важкого або 60 легкого ланцюгів антитіла, який бере участь у зв'язуванні антитіла з антигеном. Варіабельні

домени важкого ланцюга та легкого ланцюга (VH та VL, відповідно) нативного антитіла зазвичай мають схожі структури, причому кожен домен містить чотири консервативні каркасні ділянки (FR) і три гіперваріабельні ділянки (HVR) (див., наприклад, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)). В антитілі даного винаходу одна пара домену VH та домену VL, тобто споріднена пара VH/VL, специфічно зв'язується з двома його мішенями: VEGF та IL-1бета.

"DutaFab" являє собою біспецифічне антитіло, як розкрито в WO2012/163520. В DutaFab одна пара домену VH та домену VL специфічно зв'язується з двома різними епітопами, причому один паратоп містить амінокислотні залишки з CDR-H2, CDR-L1 та CDR-L3, а інший паратоп містить амінокислотні залишки з CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2. DutaFab містять два паратопа, що не перекриваються, в спорідненій парі VH/VL і можуть одночасно зв'язуватися з двома різними епітопами. DutaFab та способи їх одержання шляхом перегляду бібліотек, які містять моноспецифічні Fab-фрагменти, розкриті в WO2012/163520.

"Антитіло людини" являє собою антитіло, яке містить амінокислотну послідовність, що відповідає послідовності антитіла, яке виробляється людиною або клітиною людини чи одержане з джерела, відмінного від людини, яке використовує репертуари антитіл людини або інші послідовності, що кодують антитіла людини. Це визначення антитіла людини конкретно виключає гуманізоване антитіло, яке містить антигензв'язувальні залишки з виду, відмінного від людини.

"Консенсусна каркасна ділянка людини" являє собою каркасну ділянку, яка представляє залишки амінокислот у добірці каркасних послідовностей VL або VH імунoglobуліну людини, що зустрічаються найчастіше. Зазвичай добірка послідовностей VL або VH імунoglobуліну людини одержана з підгрупи послідовностей варіабельних доменів. В загальному випадку підгрупа послідовностей являє собою підгрупу згідно з Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), т. 1-3. В одному з варіантів реалізації для VL підгрупа являє собою підгрупу каппа I за Кабатом та соавт., раніше. В одному з варіантів реалізації для VH підгрупа являє собою підгрупу III за Кабатом та соавт., раніше.

"Фрагмент антитіла" стосується молекули, відмінної від інтактного антитіла, яка містить частину інтактного антитіла, що зв'язує антиген, з яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіл включають Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂-фрагменти; діатіла; лінійні антитіла; молекули одноланцюгових антитіл (наприклад, scFv); і поліспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл, але не обмежуються ними.

"Паратоп" або "антигензв'язувальний сайт", що використовуються взаємозамінно у даному документі, стосуються частини антитіла, яка розпізнає і зв'язується з антигеном. Паратоп утворений декількома окремими амінокислотними залишками з варіабельних доменів важкого та легкого ланцюга антитіла, розташованих у просторовій близькості у третинній структурі Fv-ділянки. Антитіла даного винаходу містять два паратопа, "що не перекриваються", в одній спорідненій парі VH/VL. Під "що не перекривається" розуміють, що жодна з амінокислот, які містяться в одному з двох паратопів, не міститься в іншому паратопі.

При використанні в даному документі "паратоп VEGF" являє собою паратоп або антигензв'язувальний сайт, який зв'язується з VEGF. Паратоп VEGF антитіла даного винаходу містить амінокислотні залишки з CDR-H2, CDR-L1 та CDR-L3 антитіла.

При використанні в даному документі "паратоп IL-1бета" являє собою паратоп або антигензв'язувальний сайт, який зв'язується з IL-1бета. Паратоп IL-1бета антитіла даного винаходу містить амінокислотні залишки з CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2 антитіла.

Вживаний в даному документі термін "VEGF" стосується будь-якого нативного VEGF з будь-якого джерела, що належить до хребетних, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, люди) і гризуни (наприклад, миші та щури), якщо не зазначено інше. Цей термін охоплює "повнорозмірний" непроцесований VEGF, а також будь-яку форму VEGF, одержану в результаті процесингу в клітині. Цей термін також охоплює варіанти VEGF природного походження, наприклад, сплайс-варіанти або алельні варіанти. Амінокислотна послідовність типового VEGF людини представлена в SEQ ID NO:26.

Терміни "антитіло до VEGF" і "антитіло, яке зв'язується з VEGF" стосуються антитіла, яке здатне зв'язувати VEGF з достатньою афінністю, так щоб антитіло можна було застосовувати як діагностичного та/або терапевтичного засобу для націлювання на VEGF. В одному варіанті реалізації ступінь зв'язування антитіла до VEGF з неспорідненим, який не є VEGF, білком становить менше ніж приблизно 10 % від зв'язування антитіла з VEGF, що вимірюється, наприклад, за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР). В деяких варіантах реалізації антитіло, яке зв'язується з VEGF, має константу дисоціації (K_D) ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ або $\leq 0,01$ нМ. Антитіло, як говорять, "специфічно зв'язується" з VEGF, коли антитіло має K_D 1 мкМ

або менше.

В контексті даного документа термін "IL-1бета" стосується будь-якого нативного IL-1бета з будь-якого джерела, що належить до хребетних, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, люди) і гризуни (наприклад, миші та щури), якщо не зазначено інше. Цей термін охоплює "повнорозмірний" непроцесований IL-1бета, а також будь-яку форму IL-1бета, одержану в результаті процесингу в клітині. Цей термін також охоплює варіанти IL-1бета природного походження, наприклад, сплайс-варіанти або алельні варіанти. Амінокислотна послідовність типового IL-1бета людини представлена в SEQ ID NO:27.

Терміни "антитіло до IL-1бета" і "антитіло, яке зв'язується з IL-1бета" стосуються антитіла, яке здатне зв'язувати IL-1бета з достатньою афінністю, так щоб антитіло можна було застосовувати як діагностичний та/або терапевтичний засіб для націлювання на IL-1бета. В одному варіанті реалізації ступінь зв'язування антитіла до IL-1бета з неспорідненим, який не є IL-1бета, білком становить менше ніж приблизно 10 % від зв'язування антитіла з IL-1бета, що вимірюється, наприклад, за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР). В деяких варіантах реалізації антитіло, яке зв'язується з IL-1бета, має константу дисоціації (K_D) ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ або $\leq 0,03$ нМ. Антитіло, як говорять, "специфічно зв'язується" з IL-1бета, коли антитіло має K_D 1 мкМ або менше.

Антитіло даного винаходу "одночасно зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини", що означає, що (а) Fab-фрагмент антитіла даного винаходу, який зв'язується з IL-1бета людини, (також) специфічно зв'язується з VEGF людини, та (б) Fab-фрагмент антитіла даного винаходу, який зв'язується з VEGF людини, (також) специфічно зв'язується з IL-1бета людини. Одночасне зв'язування можна оцінити за допомогою способів, відомих в даній галузі, наприклад, за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, як описано в даному документі.

Термін "ділянки, що визначають комплементарність" або "CDR" при використанні в даному документі стосується кожної з ділянки варіабельного домену антитіла, які є гіперваріабельними в послідовності та містять залишки, що контактують з антигеном. В загальному випадку антитіла містять шість CDR: три в домені VH (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) і три в домені VL (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Якщо не вказано інше, залишки CDR та інші залишки у варіабельному домені (наприклад, FR-залишки) пронумеровані в даному документі згідно з системою нумерації за Кабатом (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

"Каркасні ділянки" або "FR" при використанні в даному документі стосуються амінокислотних залишків варіабельного домену, які відрізняються від залишків CDR. Каркасна ділянка варіабельного домену зазвичай складається з чотирьох доменів каркасної ділянки: FR1, FR2, FR3 і FR4. Відповідно, амінокислотні послідовності CDR та FR зазвичай розташовані в наступному порядку в (а) домені VH: FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4; та (б) в домені VL: FR1—CDR-L1—FR2—CDR-L2—FR3—CDR-L3—FR4.

Згідно з системою нумерації за Кабатом, як використовується в даному документі, каркасні та CDR ділянки розташовані в наступних ділянках варіабельних доменів:

	FR1	CDR-1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VH	1-30	31-35b*	36-49	50-65	66-94	95-102	103-113
VL	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107

* в CDR-H1 можуть бути присутні додаткові амінокислоти між положенням 35b та 36, в даному документі вони називаються положеннями "35c", "35d" та "35e", як показано на фігурі 2.

Положення амінокислот згідно з системою нумерації за Кабатом, які згадуються в даному документі, показані на фігурі 2 відповідно до амінокислотних послідовностей антитіл даного винаходу. Посилання на амінокислоти в деякому положенні в амінокислотній послідовності в даному документі зроблені, як добре відомо в даній галузі, шляхом вказування відповідної амінокислоти та положення амінокислоти, наприклад, "E2" стосується залишку глутамінової кислоти, розташованої в положенні 2 за Кабатом амінокислотної послідовності відповідного домену антитіла.

"Афінність" стосується сили суми всіх нековалентних взаємодій між одиничним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитіла) і її партнера по зв'язуванню (наприклад, антигену). Якщо не вказано інше, в цьому документі афінність зв'язування стосується властивої молекулі афінності зв'язування, що відбиває взаємодію між членами пари компонентів, які зв'язуються (наприклад, антитілом і антигеном), при їх співвідношенні 1: 1. Афінність молекули X відносно її

партнера Y зазвичай може бути представлена константою дисоціації (K_D). Афінність можна вимірювати за допомогою загальноприйнятих методів, відомих у цій галузі техніки, включаючи описані в цьому документі. Конкретні ілюстративні та типові варіанти реалізації для вимірювання афінності зв'язування описані в даному документі.

5 Термін "епітоп" означає сайт на антигені, або білковий, або небілковий, з яким зв'язується антитіло. Епітопи можуть бути утворені як з ділянок замінних амінокислот (лінійний епітоп), так і містити незамінні амінокислоти (конформаційний епітоп), наприклад, знаходяться в просторовій близькості через згортання антигену, тобто шляхом третинного згортання білкового антигену. Лінійні епітопи зазвичай все ще зв'язані антитілом після впливу на білковий антиген денатураторних засобів, тоді як конформаційні епітопи зазвичай руйнуються при обробці денатураторними засобами. Епітоп містить щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7 або 8-10 амінокислот в унікальній просторовій конформації.

10 Відбір антитіл, які зв'язуються з конкретним епітопом (тобто тих, які зв'язуються з одним і тим самим епітопом), можна проводити за допомогою способів, які є рутинними для даної галузі, таких як, наприклад, окрім іншого, аланінове сканування, пептидні блоти (див. Meth. Mol. Biol. 248 (2004) 443-463), аналіз розщеплення пептидів, видалення епітопу, екстракція епітопу, хімічна модифікація антигенів (див. Prot. Sci. 9 (2000) 487-496) та перехресний конкурентний аналіз (див. "Antibodies", Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY).

20 Засноване на структурі антигену профілювання антитіл (ASAP), також відоме як профілювання за допомогою модифікації (MAP), забезпечує збереження множини моноклональних антитіл, які специфічно зв'язуються з VEGF або IL-1бета, на основі профілю зв'язування кожного з антитіл з множини з хімічно або ферментативно модифікованими поверхнями антигену (див., наприклад, US 2004/0101920). Антитіла в кожній групі зв'язуються з одним і тим самим епітопом, який може бути унікальним епітопом або таким, що явно відрізняється, або таким, що частково перекривається, з епітопом, представленим іншою групою.

Також конкурентне зв'язування можна використовувати для легкого визначення того, чи зв'язується антитіло з одним і тим самим епітопом VEGF або IL-1бета, або конкурує відносно зв'язування з ним, що й еталонне антитіло даного винаходу. Наприклад, "антитіло, яке зв'язується з тими ж епітопами на VEGF та IL-1бета", що й еталонне антитіло, стосується антитіла, яке блокує зв'язування еталонного антитіла з його антигенами у відповідному конкурентному аналізі на 50 % або більше, і, навпаки, еталонне антитіло блокує зв'язування антитіла з його антигеном у відповідному конкурентному аналізі на 50 % або більше. Також як приклад, для визначення того, чи зв'язується антитіло з тим самим епітопом, що й еталонне антитіло, еталонному антитілу дозволяють зв'язуватися з VEGF або IL-1бета за умов насичення. Після видалення надлишку еталонного антитіла оцінюють здатність антитіла, що цікавить, зв'язуватися з VEGF або IL-1бета. Якщо антитіло, що цікавить, здатне зв'язуватися з VEGF або IL-1бета після насичення зв'язування еталонного антитіла, можна зробити висновок, що антитіло, що цікавить, зв'язується з іншим епітопом відносно еталонного антитіла. Але якщо антитіло, що цікавить, не здатне зв'язуватися з VEGF або IL-1бета після насичення зв'язування еталонного антитіла, тоді антитіло, що цікавить, може зв'язуватися з тим самим епітопом, що й епітоп, який зв'язується еталонним антитілом. Для підтвердження того, чи зв'язується антитіло, що цікавить, з тим самим епітопом або тільки заважає зв'язуванню через стеричні причини, можна використовувати рутинні експерименти (наприклад, аналізи мутацій та зв'язування пептидів за допомогою ІФА, РІА, поверхневого плазмонного резонансу, цитометрії в потоці або будь-якого іншого кількісного або якісного аналізу зв'язування антитіл, доступного в даній галузі). Цей аналіз можна проводити у двох установках, тобто з обома антитілами, які є антитілом, що насичує. Якщо в обох установках тільки перше (що насичує) антитіло здатне зв'язуватися з VEGF або IL-1бета, тоді можна зробити висновок, що антитіло, яке цікавить, та еталонне антитіло конкурують стосовно зв'язування з VEGF або IL-1бета.

50 В деяких варіантах реалізації два антитіла, як вважається, зв'язуються з одним і тим самим або такими, що перекриваються, епітопами, якщо 1-, 5-, 10-, 20- або 100-кратний надлишок одного антитіла інгібує зв'язування іншого щонайменше на 50 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 90 % або навіть 99 % або більше, що виміряно в аналізі конкурентного зв'язування (див., наприклад, Junghans et al., Cancer Res. 50 (1990) 1495-1502).

55 В деяких варіантах реалізації два антитіла, як вважається, зв'язуються з одним і тим самим епітопом, якщо по суті всі амінокислотні мутації в антигені, які знижують або виключають зв'язування одного антитіла, також знижують або виключають зв'язування з іншим. Два антитіла, як вважається, мають "епітопи, що перекриваються", якщо тільки підмножина амінокислотних мутацій, які знижують або виключають зв'язування одного антитіла, знижують

або виключають зв'язування з іншим.

"Процент (%) ідентичності амінокислотної послідовності" відносно еталонної поліпептидної послідовності визначається як процентна доля амінокислотних залишків в кандидатній послідовності, які є ідентичними з амінокислотними залишками в еталонній поліпептидній послідовності, після вирівнювання послідовностей і внесення, за необхідності, гепів для досягнення максимального процента ідентичності послідовностей, і без урахування будь-яких консервативних замінів як частини ідентичності послідовностей з метою вирівнювання. Вирівнювання з метою визначення проценту ідентичності амінокислотної послідовності можна здійснити різними способами, які відомі в цій галузі техніки, наприклад, з використанням загальнодоступного комп'ютерного програмного забезпечення, такого як програмне забезпечення BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) або програмний пакет FASTA. Спеціалісти в даній галузі техніки можуть визначити відповідні параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині послідовностей, які порівнюють. Альтернативно, значення процента ідентичності можна одержати за допомогою комп'ютерної програми для порівняння послідовностей ALIGN-2. Комп'ютерна програма для порівняння послідовностей ALIGN-2 була розроблена Genentech, Inc., а вихідний код разом із документацією для користувачів було подано в Бюро реєстрації авторських прав США, Вашингтон, округ Колумбія, 20559, де він зареєстрований під номером реєстрації авторського права США TXU510087 і описаний в WO 2000/005319.

Якщо не вказано інше, для цілей даного документа, однак, значення % ідентичності амінокислотних послідовностей одержують за допомогою програми ggsearch пакета FASTA версії 36.3.8с або більш пізньої з матрицею порівняння BLOSUM50. Програмний пакет FASTA був створений W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227-258; та Pearson et. al. (1997) Genomics 46:24-36, і є загально доступним на www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml або www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta. Альтернативно, публічний сервер, доступний на fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi, можна використовувати для порівняння послідовностей, використовуючи програму ggsearch (global protein:protein) та параметри за замовчуванням (BLOSUM50; open: -10; ext: -2; Ktup=2) для забезпечення виконання загального, а не місцевого, вирівнювання. Процент ідентичності амінокислот нацей в заголовку вихідних даних вирівнювання.

Термін "молекула нуклеїнової кислоти" або "полінуклеотид" включає будь-яку сполуку та/або речовину, яка містить полімер з нуклеотидів. Кожен нуклеотид складається з основи, зокрема, пуринової або піримідинової основи (тобто цитозину (C), гуаніну (G), аденіну (A), тиміну (T) або урацилу (U)), цукру (тобто дезоксирибози або рибози) і фосфатної групи. Часто молекула нуклеїнової кислоти описана за послідовністю основ, при цьому зазначені основи представляють первинну структуру (лінійну структуру) молекули нуклеїнової кислоти. Послідовність основ, зазвичай, представлена від 5' до 3'. В даному документі термін молекула нуклеїнової кислоти охоплює дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК), включаючи, наприклад, комплементарну ДНК (кДНК) і геномну ДНК, рибонуклеїнову кислоту (РНК), зокрема, матричну РНК (мРНК), синтетичні форми ДНК і РНК і змішані полімери, що містять дві або більше з цих молекул. Молекула нуклеїнової кислоти може бути лінійною або кільцевою. Окрім того, термін молекула нуклеїнової кислоти включає як смислові, так і антисмислові ланцюги, а також одностанцюгові та двостанцюгові форми. Окрім цього, описана в цьому документі молекула нуклеїнової кислоти може містити нуклеотиди природного та неприродного походження. Приклади нуклеотидів неприродного походження включають модифіковані нуклеотидні основи з дериватизованими цукрами, або фосфатними кістяковими зв'язками, або хімічно модифікованими залишками. Молекули нуклеїнових кислот також включають молекули ДНК і РНК, придатні як вектор для прямої експресії антитіла за винаходом *in vitro* та/або *in vivo*, наприклад, в організмі хазяїна або пацієнта. Такі ДНК (наприклад, кДНК) або РНК (наприклад, мРНК) вектори можуть бути немодифікованими або модифікованими. Наприклад, мРНК може бути хімічно модифікована для підвищення стабільності РНК-вектора та/або експресії кодуваної молекули так, щоб мРНК можна було вводити суб'єкту для генерації антитіл *in vivo* (дивіться, наприклад, Stadler et al, Nature Medicine 2017, опубліковану онлайн 12 червня 2017 р., doi:10.1038/nm.4356 або EP 2101823 B1).

"Виділена" нуклеїнова кислота стосується молекули нуклеїнової кислоти, яка була відокремлена від компонента її природного оточення. Виділена нуклеїнова кислота включає молекулу нуклеїнової кислоти, яка міститься в клітинах, що зазвичай містять цю молекулу нуклеїнової кислоти, але при цьому молекула нуклеїнової кислоти присутня позахромосомно

або в хромосомному положенні, яке відрізняється від її природного хромосомного положення.

"Виділена нуклеїнова кислота, що кодує антитіло" стосується однієї або більше молекул нуклеїнових кислот, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла (або їхні фрагменти), включаючи таку молекулу(и) нуклеїнової кислоти в одному векторі або окремих векторах і таку

5 молекулу(и) нуклеїнової кислоти, присутню в одному або більше місцях в клітині-хазяїні.
 При використанні в цьому документі, термін "вектор" стосується молекули нуклеїнової кислоти, здатної репродукувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона з'єднана. Цей термін включає вектор у вигляді самореplikованої структури нуклеїнової кислоти, а також вектор, включений у геном клітини-хазяїна, в яку його внесли. Деякі вектори здатні направляти експресію нуклеїнових кислот, з якими вони функціонально зв'язані. Такі вектори називають в

10 цьому документі "експресійними векторами".
 Терміни "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїв" і "культура клітин-хазяїв" використовуються взаємозамінно та стосуються клітин, в які була введена екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство таких клітин. Клітини-хазяї включають "трансформантів" і

15 "трансформовані клітини", які включають первинно трансформовані клітини й одержане від них потомство незалежно від кількості пасажів. Потомство може не бути повністю ідентичним батьківській клітині за вмістом нуклеїнової кислоти та може містити мутації. Сюди включене мутантне потомство, яке має таку саму функцію або біологічну активність, щодо яких проводять скринінг або відбір початково трансформованих клітин.

20 Термін "фармацевтична композиція" або "фармацевтичний препарат" стосується препарату, який знаходиться у формі, яка забезпечує ефективність біологічної активності активного інгредієнта, що міститься в ньому, і який не містить додаткові компоненти, що є неприйнятно токсичними для суб'єкта, якому передбачається вводити фармацевтичну композицію.

25 "Фармацевтично прийнятний носій" стосується інгредієнта у фармацевтичній композиції або фармацевтичному препараті, відмінного від активного інгредієнта, який є нетоксичним для суб'єкта. Фармацевтично прийнятний носій включає, але не обмежується цим, буфер, допоміжну речовину, стабілізатор або консервант.

"Терапевтично ефективна кількість" засобу, наприклад, фармацевтичної композиції, стосується кількості, ефективної в дозуваннях і впродовж проміжків часу, необхідних для

30 досягнення бажаного терапевтичного або профілактичного результату.
 "Індивідуум" або "суб'єкт" є ссавцем. Ссавці включають одомашнених тварин (наприклад, корів, овець, кішок, собак і коней), приматів (наприклад, людей і приматів, які не є людьми, таких як мавпи), кроликів і гризунів (наприклад, мишей і щурів). Згідно з певними варіантами реалізації індивідуум або суб'єкт є людиною.

35 В даному документі термін "лікування" (і його граматичні варіанти, такі як "лікувати" або "такий, що лікує") стосується клінічного втручання з метою зміни природного перебігу захворювання індивідуума, якого лікують, і може проводитися як для профілактики, так і при перебігу клінічної патології. Необхідні ефекти лікування включають, але не обмежуються цим, запобігання появі або повторній появі захворювання, пом'якшення симптомів, зменшення будь-

40 яких прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, запобігання метастазуванню, зниження швидкості прогресування захворювання, зменшення інтенсивності або тимчасове полегшення хворобливого стану та ремісію або поліпшення прогнозу. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу антитіла згідно з винаходом застосовують для затримки розвитку захворювання або для уповільнення прогресування захворювання.

45 Термін "захворювання очей" при використанні в даному документі включає будь-яке захворювання очей, зв'язане з патологічним ангиогенезом та/або атрофією. Захворювання очей може характеризуватися зміненою або нерегульованою проліферацією та/або інвазією нових кровоносних судин у структури тканини ока, такої як сітківка або рогівка. Захворювання очей може характеризуватися атрофією тканини сітківки (фоторецепторів і пігментного епітелію

50 сітківки (ПЕС), що лежить в основі, і хоріокапілярів). Необмежуючі захворювання очей включають, наприклад, ВМД (наприклад, вологу ВМД, суху ВМД, проміжну ВМД, запущену ВМД та географічну атрофію (ГА)), макулярну дегенерацію, макулярний набряк, ДМН (наприклад, фокальний, нецентральный ДМО та дифузний, із залученням центрального відділу сітківки ДМН), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (ДР) (наприклад, проліферативну ДР (ПДР), непроліферативну ДР (НПДР) і висотну ДР), інші зв'язані з ішемією ретинопатії, РН, оклюзію вени сітківки (ОВС) (наприклад, форми, зв'язані з центральною веною (ОЦВС) і гілками вени (ОГВС)), ХНВ (наприклад, міопічну ХНВ), неоваскуляризацію рогівки, захворювання, зв'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, захворювання, зв'язані з неоваскуляризацією сітківки/хоріоїдальною неоваскуляризацією, центральну серозну

60 ретинопатію (ЦСР), патологічну міопію, хворобу Гіппеля-Ліндау, гістоплазмоз ока, СЕВРП,

хворобу Коутса, хворобу Норрі, розлади сітківки, зв'язані з синдромом остеопорозу-псевдогліоми (ОППГ), субкон'юнктивальний крововилив, почервоніння райдужної оболонки, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярну глаукому, пігментний ретиніт (ПР), гіпертонічну ретинопатію, ангіоматозну проліферацію сітківки, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію райдужної оболонки, внутрішньоочну неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, кистозний макулярний набряк (КМН), васкуліт, набряк диска зорового нерва, ретиніт, включаючи, окрім іншого, ЦМВ-ретиніт, меланому очей, бластому сітківки, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт), спадковий амавроз Лебера (також відомий як спадковий амавроз Лебера або САЛ), увеїт (включаючи інфекційний та неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, мультифокальний хоріоїдит), гістоплазмоз очей, блефарит, синдром сухого ока, травматичне ураження очей, хворобу Шегрена та інші офтальмологічні захворювання, причому захворювання або хвороба зв'язана з неоваскуляризацією очей, транссудацією та/або набряком сітківки або атрофією сітківки. Додаткові типові захворювання очей включають ретиношизис (аномальне розщеплення нейросенсорних шарів сітківки), захворювання, зв'язані з почервонінням райдужної оболонки (неоваскуляризація кута передньої камери), і захворювання, викликані атиповою проліферацією судинно-волоконної або волоконної тканини, включаючи всі форми проліферативної вітреоретинопатії. Типові захворювання, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, включають, окрім іншого, епідемічний кератокон'юнктивіт, дефіцит вітаміну А, надмірне носіння контактних лінз, атопічний кератит, верхній лімбальний кератит, сухий кератит крилоподібної плеви, синдром Шегрена, розацею, фліктенульозний кон'юнктивіт, сифіліс, мікобактеріальні інфекції, ліпідну дегенерацію, хімічні опіки, бактеріальні виразки, грибові виразки, інфекції простого герпесу, інфекції оперізуючого герпесу, інфекції найпростішими, саркому Капоші, виразку Мурена, маргінальну дегенерацію Террієна, крайову дистрофію рогівки, ревматоїдний артрит, системну вовчанку, поліартеріїт, травму, саркоїдоз Вегенера, склерит, синдром Стівенса-Джонсона, перифігоїдну радіальну кератотомію та відторгнення трансплантата рогівки. Типові захворювання, пов'язані з хоріоїдальною неоваскуляризацією і дефектами в судинній системі сітківки, включаючи підвищену транссудацію, аневризми та капілярне закупорення, включають, окрім іншого, діабетичну ретинопатію, макулярну дегенерацію, серповидноклітинну анемію, саркоїд, сифіліс, еластичну псевдоксантому, хворобу Педжета, оклюзію вени, оклюзію артерії, обструктивну хворобу сонної артерії, хронічний увеїт/витрит, мікобактеріальні інфекції, хворобу Лайма, системну червону вовчанку, ретинопатію недоношених, набряк сітківки (включаючи макулярний набряк), хворобу Ілза, хворобу Бехчета, інфекції, яка викликають ретиніт або хоріоїдит (наприклад, мультифокальний хоріоїдит), ймовірний гістоплазмоз очей, хворобу Беста (вроджену макулярну дегенерацію), міопію, ямки диска зорового нерва, pars planitis, відшарування сітківки (наприклад, хронічне відшарування сітківки), синдром підвищеної в'язкості крові, токсоплазмоз, травму та ускладнення після лазерної корекції. Типові захворювання, пов'язані з атрофією тканин сітківки (фоторецепторів і ПЭС, що лежить в основі), включають, окрім іншого, атрофічну або неексудативну ВМД (наприклад, географічну атрофію або запущену суху ВМД), атрофію жовтої плями (наприклад, атрофію, зв'язану з неоваскуляризацією та/або географічною атрофією), діабетичну ретинопатію, хворобу Штаргардта, дистрофію очного дна Сорсбі, ретиношизис та пігментний ретиніт.

Термін "листівка-вкладка" використовується для позначення інструкцій, які зазвичай включають в комерційні пакування терапевтичних продуктів, що містять інформацію про показання, застосування, дозування, введення, комбіновану терапію, протипоказання та/або попередження щодо використання таких терапевтичних продуктів.

2. Детальний опис варіантів реалізації даного винаходу

В одному аспекті цей винахід оснований, частково, на забезпеченні біспецифічних антитіл для терапевтичного застосування. В деяких аспектах забезпечуються антитіла, які зв'язуються з VEGF людини та IL-1бета людини. Антитіла даного винаходу придатні, наприклад, для діагностики або лікування судинних захворювань, наприклад, судинних захворювань очей.

A. Типові антитіла, які зв'язуються з VEGF людини та IL-1бета людини

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіла, які зв'язуються з VEGF людини та IL-1бета людини. В одному аспекті забезпечуються виділені антитіла, які зв'язуються з VEGF людини та IL-1бета людини. В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіла, які специфічно зв'язуються з VEGF людини та IL-1бета людини.

В деяких аспектах забезпечується антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, причому антитіло містить паратоп VEGF (тобто антигензв'язувальний сайт, який зв'язується з VEGF) та паратоп IL-1бета (тобто антигензв'язувальний сайт, який зв'язується з IL-1бета) в одній спорідненій парі домену VL та домену VH, причому

- паратоп VEGF містить амінокислотні залишки з CDR-H2, CDR-L1 та CDR-L3 антитіла, причому паратоп IL-1бета містить амінокислотні залишки з CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2 антитіла; та/або

5 - пара варіабельного домену легкого ланцюга та варіабельного домену важкого ланцюга одночасно зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини; та/або

- жодна з амінокислот, які містяться в паратопі VEGF, не міститься в паратопі IL-1бета; та/або

- жодна з амінокислот, які містяться в паратопі IL-1бета, не міститься в паратопі VEGF; та/або

10 - антитіло зв'язується з тим самим епітопом на VEGF людини та з тим самим епітопом на IL-1бета людини, що й антитіло з варіабельним доменом важкого ланцюга з SEQ ID NO:11 та варіабельним доменом легкого ланцюга з SEQ ID NO:12; та/або

- Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF121 людини з KD менше 10 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, та (ii) з IL-1бета людини з KD менш ніж 30 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу; та/або

15 - Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації більше ніж 70 °С; та/або

- Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °С, що вимірюється за допомогою динамічного розсіювання світла; та/або

20 - зв'язування Fab-фрагмента антитіла з VEGF людини інгібує зв'язування VEGF з VEGFR2 з IC50 менше 50 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу; і причому зв'язування Fab-фрагмента антитіла з IL-1бета людини інгібує зв'язування IL-1бета з IL-1бетаR1 з IC50 менш ніж 30 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

25 В іншому аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.

30 В іншому аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

45 В іншому аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить домен VH, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 та D101, та домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 та Y96, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом. В одному варіанті реалізації антитіло містить паратоп VEGF, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66 та R83, і наступні амінокислотні залишки в домені VL: I2, Y27, W27a, S27c, S27d, E67, D68, Q69, R92, Y93, H94 та Y96; і паратоп IL-1бета, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, K94, D95, V96, F98 та D101, і наступні амінокислотні залишки в домені VL: L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, Y91.

50 В іншому аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12.

60 В іншому аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12.

92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11, причому домен VH містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 та D101; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12, причому домен VL містить амінокислотні залишки I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 та Y96, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

В іншому аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12.

В іншому аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11, причому домен VH містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, R66, R83 та K94; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12, причому домен VL містить амінокислотні залишки I2, Y49, G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

В іншому аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12.

В іншому аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами.

В іншому аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами, причому амінокислотні заміни розташовані в положеннях 3-25, 36-49, 97-82с, 84-93 або 103-113

SEQ ID NO:11; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами, причому амінокислотні заміни розташовані в положеннях 1, 4, 6, 8-23, 35-48, 58-66, 70-88 або 98-107 SEQ ID NO:12, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

В іншому аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами.

В іншому аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, і яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить домен VH, який має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11. В деяких аспектах послідовність VH, яка має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції у порівнянні з еталонною послідовністю, але антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, яке містить цю послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з VEGF людини та IL-1бета людини. В деяких аспектах була проведена заміна, вставка та/або делеція загалом 1-10 амінокислот в SEQ ID NO:11. В деяких аспектах заміни, вставки або делеції знаходяться в ділянці за межами CDR (тобто в FR). В конкретному аспекті VH містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13; (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14; та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15.

В одному аспекті цей винахід забезпечує антитіло, яке містить домен VL, який має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12. В деяких аспектах послідовність VL, яка має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції у порівнянні з еталонною послідовністю, але антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, яке містить цю послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з VEGF людини та IL-1бета людини. В деяких аспектах була проведена заміна, вставка та/або делеція загалом 1-10 амінокислот в SEQ ID NO:12. В деяких аспектах заміни, вставки або делеції знаходяться в ділянці за межами CDR (тобто в FR). В конкретному аспекті VL містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.

В іншому аспекті забезпечується антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, причому антитіло містить послідовність VH, як у будь-якому з аспектів, наведених вище, і послідовність VL, як в будь-якому з аспектів, наведених вище. В одному аспекті антитіло містить послідовності VH та VL в SEQ ID NO:11 та SEQ ID NO:12, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В іншому аспекті забезпечується антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета

людини, причому антитіло містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:20 і амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:19.

В іншому аспекті забезпечується антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, причому антитіло містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:18 і амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:19.

В додатковому аспекті даного винаходу антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, згідно з будь-яким з вищенаведених аспектів, є моноклональним антитілом. В одному аспекті антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, є фрагментом антитіла, наприклад, фрагментом Fv, Fab, Fab', scFv, діатілом або F(ab')₂. В іншому аспекті антитіло являє собою повнорозмірне антитіло.

В додатковому аспекті антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, згідно з будь-яким з вищенаведених аспектів може включати будь-яку з ознак, окремо або в комбінації, як описано в розділах 1-7 нижче.

1. Аффінність антитіл

У деяких варіантах реалізації антитіло, представлене в даному документі, зв'язується з VEGF з константою дисоціації (K_D) ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ або $\leq 0,01$ нМ. В деяких варіантах реалізації антитіло, яке зв'язується з IL-1бета, має константу дисоціації (K_D) ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ або $\leq 0,03$ нМ.

В одному аспекті K_D вимірюють, використовуючи аналіз методом поверхневого плазмонного резонансу BIACORE®.

Наприклад, K_D антитіла, яке зв'язується з VEGF, вимірюють в аналізі із застосуванням BIACORE®-2000 або BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Піскатауей, Нью-Джерсі), який виконують при 25 °C з іммобілізованим VEGF121 з чіпами C1 при ~10 одиницях відповіді (ОВ). Для вимірювань кінетики двократні послідовні розведення Fab (від 1,2 нМ до 100 нМ) вводять у HBS-P+ (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl pH 7,4, 0,05 % поверхнево-активної речовини P20) при 25 °C при швидкості потоку приблизно 30 мкл/хв. Швидкості асоціації ($k_{ас}$) та швидкості дисоціації ($k_{дис}$) розраховують, використовуючи просту один-до-одного модель зв'язування Ленгмюра (оцінювальне програмне забезпечення BIACORE®, версія 3.2), шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації та дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (K_D) розраховували як співвідношення $k_{дис}/k_{ас}$. Див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999).

Наприклад, K_D антитіла, яке зв'язується з IL-1 бета, вимірюють в аналізі із застосуванням BIACORE®-2000 або BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Піскатауей, Нью-Джерсі), який виконують при 25 °C з іммобілізованим біспецифічним антитілом з чіпами C1 при ~20 одиницях відповіді (ОВ). Для вимірювань кінетики двократні послідовні розведення IL-1бета людини (від 0,74 нМ до 60 нМ) вводять у HBS-P+ (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl pH 7,4, 0,05 % поверхнево-активної речовини P20) при 25 °C при швидкості потоку приблизно 30 мкл/хв. Швидкості асоціації ($k_{ас}$) та швидкості дисоціації ($k_{дис}$) розраховують, використовуючи просту один-до-одного модель зв'язування Ленгмюра (оцінювальне програмне забезпечення BIACORE®, версія 3.2), шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації та дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (K_D) розраховували як співвідношення $k_{дис}/k_{ас}$. Див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999).

2. Фрагменти антитіл

В деяких аспектах антитіло, яке представлено в даному документі, є фрагментом антитіла.

В одному аспекті фрагмент антитіла є фрагментом Fab, Fab', Fab'-SH або F(ab')₂, зокрема Fab-фрагмент. Розщеплювання інтактних антитіл папаїном дозволяє одержувати два ідентичних антигензв'язувальних фрагмента, званих "Fab"-фрагментами, кожен з яких містить варіабельні домени важкого та легкого ланцюга (VH та VL, відповідно), а також константний домен легкого ланцюга (CL) і перший константний домен важкого ланцюга (CH1). Таким чином, термін "Fab-фрагмент" стосується фрагмента антитіла, який містить легкий ланцюг, який містить домен VL та домен CL, і фрагмент важкого ланцюга, який містить домен VH та домен CH1. "Fab'-фрагменти" відрізняються від Fab-фрагментів додаванням залишків на карбоксильному кінці домену CH1, що містять один або більше залишків цистеїну з шарнірної ділянки антитіла. Fab'-SH являють собою Fab'-фрагменти, в яких залишок(ки) цистеїну константних доменів несе вільну тільну групу. Обробка пепсином дозволяє одержати F(ab')₂-фрагмент, який має два антигензв'язувальних сайти (два Fab-фрагменти) і частину Fc-ділянки. Обговорення фрагментів Fab і F(ab')₂, які містять залишки епітопа зв'язування рецептора реутилізації та мають подовжений час напівжиття in vivo, дивіться в патенті США № 5869046.

Фрагменти антитіл можна одержувати різними способами, включаючи, але без обмеження ними, протеолітичне розщеплення інтактного антитіла, а також рекомбінантне вироблення рекомбінантними клітинами-хазяями (наприклад, E. coli, CHO), як описано в даному документі.

3. Термічна стабільність

Антитіла, представлені у даному документі, характеризуються чудовою термічною стабільністю. У деяких варіантах реалізації Fab-фрагмент антитіла, представлений у даному документі, характеризується температурою початку агрегації більше ніж 70 °С. У деяких варіантах реалізації Fab-фрагмент антитіла, представлений у даному документі, характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °С, що вимірюється за допомогою динамічного розсіяння світла.

4. Антитіла, одержані з бібліотек

У деяких аспектах антитіло, представлене у даному документі, одержане з бібліотеки. Антитіла згідно з даним винаходом можуть бути виділені шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек антитіл з бажаною активністю або властивостями. Методи скринінгу комбінаторних бібліотек розглянуті, наприклад, в Lerner et al. в *Nature Reviews* 16:498-508 (2016). Наприклад, в цій галузі техніки відомі різні способи одержання бібліотек фагового дисплею і скринінг таких бібліотек на предмет антитіл, що володіють бажаними характеристиками зв'язування. Такі методи розглянуті, наприклад, у Frenzel et al. в *mAbs* 8:1177-1194 (2016); Bazan et al. в *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 8:1817-1828 (2012) та Zhao et al. в *Critical Reviews in Biotechnology* 36:276-289 (2016), а також в Hoogenboom et al. в *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) та в Marks and Bradbury в *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003).

У деяких способах на основі фагового дисплею репертуари генів VH та VL окремо клонують за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та випадковим чином рекомбінують в фагових бібліотеках, які потім можна піддавати скринінгу відносно антигензв'язувального фагу, як описано в Winter et al. в *Annual Review of Immunology* 12: 433-455 (1994). Фаг зазвичай відображає фрагменти антитіл у вигляді одноланцюгових фрагментів Fv (scFv) або фрагментів Fab. Бібліотеки з імунованих джерел дозволяють одержати антитіла з високою афінністю до імуногена без необхідності конструювання гібридом. В альтернативному варіанті можна клонувати наївний репертуар (наприклад, від людини) для одержання єдиного джерела антитіл до широкого спектра чужорідних, а також аутоантигенів без будь-якої імунізації, як описано в Griffiths et al. в *EMBO Journal*, 12: 725-734 (1993). Крім того, наївні бібліотеки також можна одержувати синтетично, клонуючи неперегруповані сегменти V-генів зі стовбурових клітин і використовуючи ПЛР-праймери, що містять випадкові послідовності, для кодування високоваріабельних ділянок CDR3 і здійснення перегруповання *in vitro*, як описано в Hoogenboom and Winter в *Journal of Molecular Biology* 227: 381-388 (1992). Патентні публікації, в яких описані фагові бібліотеки антитіл людини, включають, наприклад: патенти США №№ 5750373; 7985840; 7785903 та 8679490, а також публікації патентів США №№ 2005/0079574, 2007/0117126, 2007/0237764 та 2007/0292936.

Додаткові приклади методів, відомих в даній галузі для скринінгу комбінаторних бібліотек для антитіл з бажаною активністю або активностями, включають рибосомний та мРНК дисплей, а також методи для дисплею і вибору антитіл на бактеріях, клітинах ссавців, клітинах комах або клітинах дріжджів. Методи для дисплею поверхні дріжджів розглянуті, наприклад, в Scholler et al. в *Methods in Molecular Biology* 503:135-56 (2012) та в Cherf et al. в *Methods in Molecular biology* 1319:155-175 (2015), а також в Zhao et al. в *Methods in Molecular Biology* 889:73-84 (2012). Методи рибосомного дисплею описані, наприклад, в He et al. в *Nucleic Acids Research* 25:5132-5134 (1997) та в Hanes et al. в *PNAS* 94:4937-4942 (1997).

Антитіла або фрагменти антитіл, виділені з бібліотек людських антитіл, вважаються в цьому документі людськими антитілами або фрагментами людських антитіл.

5. Мультиспецифічні антитіла

У деяких аспектах запропоноване у даному документі антитіло являє собою мультиспецифічне антитіло. "Мультиспецифічні антитіла" являють собою моноклональні антитіла, які мають специфічності зв'язування для щонайменше двох різних сайтів, тобто різних епітопів на різних антигенах або різних епітопів на одному й тому ж антигені. У деяких аспектах мультиспецифічне антитіло має три або більше специфічності зв'язування.

Мультиспецифічні антитіла з трьома або більше специфічностями зв'язування, які містять антитіла, забезпечені у даному документі, можуть бути представлені в асиметричній формі з кросовером доменів в одному або більше зв'язувальних плечах однієї й тієї ж специфічності до антигену, тобто шляхом заміни доменів VH/VL (див., наприклад, WO 2009/080252 та WO 2015/150447), доменів CH1/CL (див., наприклад, WO 2009/080253) або повних Fab-фрагментів (див., наприклад, WO 2009/080251, WO 2016/016299, також див. Schaefer et al, PNAS, 108 (2011) 1187-1191, та Klein et al., *MAbs* 8 (2016) 1010-20). Різні додаткові молекулярні формати для мультиспецифічних антитіл відомі у даній галузі та включені у цей документ (див., наприклад, Spiess et al., *Mol Immunol* 67 (2015) 95-106).

6. Варіанти антитіл

У деяких аспектах передбачені варіанти амінокислотної послідовності антитіл, представлених в даному документі. Наприклад, бажаною може бути зміна афінності зв'язування та/або інших біологічних властивостей антитіла. Варіанти амінокислотної послідовності антитіла можуть бути одержані шляхом введення відповідних модифікацій в нуклеотидну послідовність, що кодує антитіло, або за допомогою пептидного синтезу. Такі модифікації включають, наприклад, делеції, та/або вставки, та/або заміни залишків в амінокислотних послідовностях антитіла. Для одержання кінцевої конструкції можна здійснювати будь-яку комбінацію делецій, вставок і замін за умови, що кінцева конструкція має необхідні характеристики, наприклад, зв'язування антигена.

У деяких аспектах запропоновані варіанти антитіла, які містять одну або більше амінокислотних замін. Сайти, які представляють інтерес для замісного мутагенезу, включають CDR та FR. Консервативні заміни показані в таблиці нижче під заголовком "переважні заміни". Більш суттєві зміни представлені в таблиці 1 під заголовком "типові заміни", і як додатково описано нижче в посиланні на класи амінокислотних бокових ланцюгів. Амінокислотні заміни можна вносити в антитіло, що представляє інтерес, і проводити скринінг одержаних продуктів відносно необхідної активності, наприклад, збереження/покращення зв'язування антигену, зниження імуногенності або покращення АЗКЦ або КЗЦ.

Таблиця

Вихідний Залишок	Типові заміни	Переважні заміни
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Амінокислоти можна поділити на групи відповідно до загальних властивостей бічних ланцюгів:

- (1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислі: Asp, Glu;
- (4) основні: His, Lys, Arg;
- (5) залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro;
- (6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміни спричинять заміну представника одного з цих класів на представника іншого класу.

Один з варіантів заміни включає заміну одного або більше амінокислотних залишків гіперваріабельної ділянки батьківського антитіла (наприклад, гуманізовані або людського антитіла). Зазвичай одержаний (одержані) варіант (варіанти), відібраний (відібрані) для подальшого дослідження, характеризується (характеризуються) модифікаціями (наприклад, покращенням) певних біологічних властивостей (наприклад, підвищеною афінністю, зниженою імуногенністю) у порівнянні з вихідним антитілом та/або значною мірою зберігає (зберігають)

певні біологічні властивості вихідного антитіла. Типовий замісний варіант являє собою антитіло з дозрілою афінністю, яке зручно одержувати, наприклад, з використанням методик дозрівання афінності на основі фагового дисплею, таких як описані в цьому документі. Коротко, один або більше залишків CDR піддають мутації та варіантні антитіла відображаються на поверхні фага, і проводять скринінг щодо конкретного виду біологічної активності (наприклад, афінності зв'язування).

Модифікації (наприклад, заміни) в CDR можна здійснити, наприклад, з метою поліпшення афінності антитіла. Такі зміни можуть бути зроблені в "гарячих точках" CDR, тобто в залишках, що кодуються кодонами, які з високою частотою піддаються мутації під час процесу соматичного дозрівання (див., наприклад, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)), та/або в залишках, які контактують з антигеном, при цьому тестують афінність зв'язування одержаного варіанту VH або VL. Дозрівання афінності шляхом конструювання і повторного відбору з вторинних бібліотек було описано, наприклад, в *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., Ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). У деяких аспектах дозрівання афінності різноманітність вводять у варіабельні гени, вибрані для дозрівання, будь-яким з низки способів (наприклад, ПЛР зниженої точності, шафлінг ланцюгів або олігонуклеотид-направлений мутагенез). Потім створюють вторинну бібліотеку. Після цього бібліотеку піддають скринінгу для виявлення будь-яких варіантів антитіл з бажаною афінністю. Інший спосіб для внесення різноманітності включає підходи, спрямовані на CDR, в яких кілька амінокислотних залишків CDR (4-6 амінокислотних залишків поспіль) є рандомізованими. Залишки CDR, залучені до зв'язування антигену, можуть бути конкретно ідентифіковані, наприклад, з використанням аланін-скануючого мутагенезу або моделювання. Зокрема, мішенями часто є CDR-H3 і CDR-L3.

У деяких аспектах заміни, вставки або делеції можуть траплятися в межах однієї або більше CDR, за умови, що такі зміни істотно не знижують здатність антитіла зв'язуватись з антигеном. Наприклад, у CDR можна проводити консервативні зміни (наприклад, консервативні заміни, запропоновані в цьому документі), які істотно не знижують афінність зв'язування. Такі зміни можуть, наприклад, бути поза залишками, які контактують з антигеном, в CDR. У деяких послідовностях варіантів VH і VL, наведених вище, кожна CDR або залишається незмінною, або містить не більше однієї, двох або трьох амінокислотних замін.

Зручний спосіб виявлення залишків або ділянок антитіла, які можуть бути мішенями для мутагенезу, називається "аланін-скануючим мутагенезом", описаним Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. У цьому способі амінокислотний залишок або групу амінокислотних залишків-мішеней (наприклад, заряджені амінокислотні залишки, такі як Arg, Asp, His, Lys і Glu) ідентифікують і замінюють нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою (наприклад, аланіном або поліаланіном) для визначення впливу на взаємодію антитіла з антигеном. Додаткові заміни можна вносити в амінокислотні положення, які демонструють функціональну чутливість до початкових замін. Як альтернатива або на додаток можна використовувати кристалічну структуру комплексу антиген-антитіло для ідентифікації точок контакту між антитілом і антигеном. Такі контактні залишки та сусідні залишки можна націлювати або вилучати з кандидатів для заміни. Можна проводити скринінг варіантів, щоб визначити, чи мають вони необхідні властивості.

Вставки амінокислотних послідовностей включають аміно- та/або карбокси-кінцеві злиття з діапазоном довжини від одного залишку до поліпептидів, що містять сто або більше залишків, а також вставки всередині послідовності одного або деякої кількості амінокислотних залишків. Приклади вставок на кінці включають антитіло з N-кінцевим метіонільним залишком. Інші інсерційні варіанти молекули антитіла включають злиття з N- або C-кінцем антитіла з ферментом (наприклад, для терапії ADEPT (направленої на антитіло ферментної терапії проліками)) або поліпептидом, який збільшує період напіввиведення антитіла з сироватки.

а) Варіанти за глікозилуванням

У деяких аспектах антитіло, представлене в цьому документі, змінюють так, щоб збільшити або зменшити ступінь глікозилування антитіла. Додавання сайтів глікозилування в антитіло або їх видалення традиційно можна здійснювати шляхом зміни амінокислотної послідовності так, щоб створити або видалити один або більше сайтів глікозилування.

Якщо антитіло містить Fc-ділянку, можна змінювати приєднаний до неї олігосахарид. Нативні антитіла, що їх виробляють клітини ссавців, зазвичай містять розгалужений біантенарний олігосахарид, який зазвичай приєднаний за допомогою N-зв'язку до Asn297 CH2-домени Fc-ділянки. Дивіться, наприклад, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Олігосахарид може містити різні вуглеводи, наприклад, манозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу та сіалову кислоту, а також фукозу, приєднану до GlcNAc у "стеблі" біантенарної олігосахаридної структури. У деяких аспектах можна виконати модифікації олігосахариду в антитілі за

винаходом для створення варіантів антитіл з певними покращеними властивостями.

В одному аспекті запропоновані варіанти антитіл, які містять нефукозилізований олігосахарид, тобто олігосахаридну структуру з недостатньою кількістю фукози, приєднаної (безпосередньо або опосередковано) до Fc-ділянки. Такий нефукозилізований олігосахарид (який також називають "афукозилізованим" олігосахаридом), зокрема представляє N-зв'язаний олігосахарид з недостатньою кількістю фукозного залишку, приєднаного до першої GlcNAc в основі біантенарної олігосахаридної структури. В одному аспекті запропоновані варіанти антитіла, які містять збільшену долю нефукозилізованих олігосахаридів у Fc-ділянці у порівнянні з нативним або батьківським антитілом. Наприклад, доля нефукозилізованих олігосахаридів може становити щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 80 % або навіть приблизно 100 % (тобто немає фукозилізованих олігосахаридів). Процент нефукозилізованих олігосахаридів представляє (середню) кількість олігосахаридів без фукозних залишків відносно суми всіх олігосахаридів, приєднаних до Asn 297 (наприклад, складних, гібридних структур та структур з високим вмістом манози), згідно з результатами вимірювання методом мас-спектрометрії MALDI-TOF, наприклад, як описано в WO 2006/082515. Asn297 стосується залишку аспарагіну, розташованому в позиції 297 у Fc ділянки (згідно з нумерацією EU залишків Fc ділянки); при цьому Asn297 також може бути розташований на близько ± 3 амінокислот вище або нижче позиції 297, тобто між позиціями 294 і 300, внаслідок незначних варіацій послідовностей антитіла. Такі антитіла, які містять збільшену долю нефукозилізованих олігосахаридів у Fc-ділянці, можуть мати покращене зв'язування з рецептором Fc γ R1IIa та/або покращену ефекторну функцію, зокрема покращену функцію АЗКЦ. Див., наприклад, US 2003/0157108; US 2004/0093621.

Приклади клітинних ліній, здатних продукувати антитіла зі зменшеним фукозилуванням, включають клітини CHO Lec13 з недостатністю за фукозилуванням білка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); US 2003/0157108 та WO 2004/056312, особливо в Прикладі 11), а клітинні лінії з нокаутом, такі як нокаутівані за геном альфа-1,6-фукозилтрансферази, FUT8, клітини CHO (див., наприклад, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614-622 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); та WO2003/085107), або клітини зі зниженою або анульованою активністю синтезу GDP-фукози або транспортного білку (див., наприклад, US2004259150, US2005031613, US2004132140, US2004110282).

У додатковому аспекті запропоновані варіанти антитіл з роздвоєними олігосахаридами, наприклад, у яких біантенарний олігосахарид, приєднаний до Fc-ділянки антитіла, розділений навпіл GlcNAc. Такі варіанти антитіла можуть мати знижений рівень фукозилування та/або покращену функцію АЗКЦ, як описано вище. Приклади таких варіантів антитіла описані, наприклад, в Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999); Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006); WO 99/54342; WO 2004/065540, WO 2003/011878.

Відповідно до цього винаходу також запропоновані варіанти антитіла з щонайменше одним залишком галактози в олігосахариді, прикріпленому до Fc-ділянки. Такі варіанти антитіла можуть характеризуватися покращеною функцією КЗЦ. Такі варіанти антитіла описані, наприклад, у WO 1997/30087; WO 1998/58964; і WO 1999/22764.

б) Варіанти за Fc-ділянкою

У певних аспектах одну або більше амінокислотних модифікацій можна вносити в Fc-ділянку антитіла, запропонованого в цьому документі, з одержанням, таким чином, варіанту за Fc-ділянкою. Варіант за Fc-ділянкою може містити послідовність Fc-ділянки людини (наприклад, Fc-ділянку IgG₁, IgG₂, IgG₃ або IgG₄ людини), яка містить амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну) в одному або більше амінокислотних положеннях.

Згідно з деякими аспектами цей винахід передбачає варіант антитіла, який має деякі, але не всі ефекторні функції, що робить його бажаним кандидатом для варіантів застосування, в яких важливим є період напівжиття антитіла за умов *in vivo*, але при цьому певні ефекторні функції (такі як комплементзалежна цитотоксичність (КЗЦ) та антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність (АЗКЦ)) не потрібні або шкідливі. Для підтвердження зниження/послаблення КЗЦ- та/або АЗКЦ-активності можна виконати аналіз цитотоксичності *in vitro* та/або *in vivo*. Наприклад, аналізи на зв'язування Fc-рецепторів (FcR) можна проводити для забезпечення того, що антитіло не має зв'язування з Fc γ R (таким чином, ймовірно, не має активності АЗКЦ), але зберігає здатність зв'язування з FcRn. Первинні клітини для опосередкування АЗКЦ, NK-клітини, експресують лише Fc γ RIII, тоді як моноцити експресують Fc γ RI, Fc γ RII і Fc γ RIII. Експресія FcR на гемопоетичних клітинах узагальнена в Таблиці 3 на сторінці 464 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991). Необмежуючі приклади методів *in vitro* аналізу для оцінки АЗКЦ-активності молекули, що становить інтерес, описані в патенті США №5500362

(див., наприклад, Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) та Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5821337 (див. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). В альтернативному варіанті можна використовувати нерадіоактивні методи аналізу (див., наприклад, нерадіоактивний аналіз цитотоксичності АСТІ™ для проточної цитометрії (CellTechnology, Inc. Маунтін-В'ю, Каліфорнія) і нерадіоактивний аналіз цитотоксичності CytoTox 96® (Promega, Медисон, Вісконсин). Ефекторні клітини, відповідні для такого аналізу, включають мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) і природні клітини-кілери (NK). Альтернативно або додатково, АЗКЦ-активність молекули, що становить інтерес, можна оцінити *in vivo*, наприклад, в моделі на тваринах, як розкрито в Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Можна також здійснювати аналізи зв'язування С1q, щоб підтвердити, що антитіло не здатне зв'язувати С1q, а отже не має КЗЦ-активності. Див., наприклад, ELISA стосовно зв'язування С1q та С3с, у WO 2006/029879 та WO 2005/100402. Для того, щоб оцінити активацію комплекменту можна виконати аналіз КЗЦ (див., наприклад, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); і Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). Визначення зв'язування з FcRn та *in vivo* кліренсу/часу напіввиведення також можна виконати з використанням способів, відомих в цій галузі техніки (див., наприклад, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006); WO 2013/120929 A1).

Антитіла зі зниженою ефекторною функцією включають антитіла із заміною одного або декількох залишків Fc-ділянки 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 (патент США № 6737056). Такі Fc-мутанти включають Fc-мутантів із замінами у двох або більше амінокислотних позиціях 265, 269, 270, 297 і 327, у тому числі так звані Fc-мутанти "DANA" із заміною залишків 265 і 297 на аланін (патент США № 7332581).

Описано деякі варіанти антитіл з поліпшеним або зменшеним зв'язуванням з FcR (див., наприклад, патент США № 6737056, WO 2004/056312, і Shields et al., J. Biol. Chem. 9 (2): 6591-6604 (2001)).

У деяких аспектах варіант антитіла містить Fc-ділянку з однієї або більше амінокислотними замінами, які покращують АЗКЦ, наприклад, з замінами в положеннях 298, 333 та/або 334 Fc-ділянку (нумерація залишків за системою EU).

У деяких аспектах варіант антитіла містить Fc-ділянку з однією або більше амінокислотними замінами, які знижують зв'язування з FcγR, наприклад, з замінами у положеннях 234 та 235 Fc-ділянки (нумерація залишків за EU). В одному аспекті заміни представляють L234A та L235A (LALA). У деяких аспектах варіант антитіла додатково містить D265A та/або P329G в Fc-ділянці, одержаній з Fc-ділянки IgG₁ людини. В одному аспекті заміни представляють L234A, L235A та P329G (LALA-PG) в Fc-ділянці, одержаній з Fc-ділянки IgG₁ людини. (Див., наприклад, WO 2012/130831). В іншому аспекті заміни представляють L234A, L235A та D265A (LALA-DA) в Fc-ділянці, одержаній з Fc-ділянки IgG₁ людини.

У деяких аспектах зміни зроблені в Fc-ділянці, що призвело до зміни (тобто або до поліпшення, або до погіршення) зв'язування С1q та/або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ), наприклад, як описано в патенті США № 6194551, міжнародній патентній заявці WO 99/51642 і публікації Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Антитіла зі збільшеним періодом напіввиведення та поліпшеним зв'язуванням з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), який відповідає за перенесення материнських IgG до плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) and Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описані в US2005/0014934 (Hinton et al.). Ці антитіла містять Fc-ділянку з однією або більше замінами, які покращують зв'язування Fc-ділянки з FcRn. Такі Fc-варіанти включають варіанти з замінами в одному або більше залишках Fc-ділянки: 238, 252, 254, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, заміна залишку 434 Fc-ділянки (див., наприклад, патент США № 7371826; Dall'Acqua, W.F., et al. J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524).

Залишки Fc-ділянки, важливі для взаємодії мишачого Fc-мишачого FcRn, були ідентифіковані сайт-направленим мутагенезом (див., наприклад, Dall'Acqua, W.F., et al. J. Immunol 169 (2002) 5171-5180). Залишки I253, H310, H433, N434 та H435 (нумерація згідно з EU-індексом) залучені у взаємодію (Medesan, C., et al., Eur. J. Immunol. 26 (1996) 2533; Firan, M., et al., Int. Immunol. 13 (2001) 993; Kim, J.K., et al., Eur. J. Immunol. 24 (1994) 542). Залишки I253, H310 та H435, як було виявлено, є важливими для взаємодії Fc людини з мишачим FcRn (Kim, J.K., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819). Дослідження комплексу Fc людини-FcRn людини показали, що залишки I253, S254, H435 та Y436 є важливими для взаємодії (Firan, M., et al., Int. Immunol. 13 (2001) 993; Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604). В Yeung, Y.A., et al. (J. Immunol. 182 (2009) 7667-7671) повідомляли та досліджували різні мутанти залишків 248-

259, та 301-317, та 376-382, та 424-437.

У певних аспектах варіант антитіла містить Fc-ділянку з однією або більше амінокислотними замінами, які знижують зв'язування з FcRn, наприклад, з замінами в положеннях 253, та/або 310, та/або 435 Fc-ділянки (нумерація залишків згідно з EU). У деяких аспектах варіант антитіла містить Fc-ділянку з амінокислотними замінами в положеннях 253, 310 та 435. В одному аспекті заміни представляють I253A, H310A та H435A в Fc-ділянці, одержаній з Fc-ділянки IgG₁ людини. Див., наприклад, Grevys, A., et al., J. Immunol. 194 (2015) 5497-5508.

У певних аспектах варіант антитіла містить Fc-ділянку з однією або більше амінокислотними замінами, які знижують зв'язування з FcRn, наприклад, з замінами в положеннях 310, та/або 433, та/або 436 Fc-ділянку (нумерація залишків згідно з EU). У деяких аспектах варіант антитіла містить Fc-ділянку з амінокислотними замінами в положеннях 310, 433 та 436. В одному аспекті заміни представляють H310A, H433A та Y436A в Fc-ділянці, одержаній з Fc-ділянки IgG₁ людини. (Див., наприклад, WO 2014/177460 A1).

У деяких аспектах варіант антитіла містить Fc-ділянку з однією або більше амінокислотними замінами, які покращують зв'язування з FcRn, наприклад, з замінами в положеннях 252, та/або 254, та/або 256 Fc-ділянки (нумерація залишків згідно з EU). У деяких аспектах варіант антитіла містить Fc-ділянку з амінокислотними замінами в положеннях 252, 254 та 256. В одному аспекті заміни представляють M252Y, S254T та T256E в Fc-ділянці, одержаній з Fc-ділянки IgG₁ людини. Див. також Duncan & Winter, Nature 322: 738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; і WO 94/29351 щодо інших прикладів варіантів Fc-ділянки.

C-кінець важкого ланцюга представленого в цьому документі антитіла може бути повним C-кінцем, що закінчується амінокислотними залишками PGK. C-кінець важкого ланцюга може бути вкороченим C-кінцем, в якому було вилучено один або два C-кінцеві амінокислотні залишки. В одному переважному аспекті C-кінець важкого ланцюга є вкороченим C-кінцем, що закінчується PG. В одному аспекті з усіх представлених в даному документі аспектів антитіло, яке містить важкий ланцюг, що містить C-кінцевий СН3-домен, описаний у цьому документі, містить C-кінцевий гліцин-лізиновий дипептид (G446 та K447, нумерація згідно з індексом EU положень амінокислот). В одному аспекті з усіх представлених в даному документі аспектів антитіло, яке містить важкий ланцюг, що містить C-кінцевий СН3-домен, описаний у цьому документі, містить C-кінцевий залишок гліцину (G446, нумерація згідно з індексом EU положень амінокислот).

в) Варіанти антитіл, сконструйовані з використанням цистеїну

У деяких аспектах може бути бажаним створення антитіл, сконструйованих з використанням цистеїну, наприклад, антитіл TN10MABTM, в яких один або більше залишків заміщені залишками цистеїну. В конкретних аспектах заміщені залишки знаходяться в доступних сайтах антитіла. При заміні цих залишків цистеїном реакційноздатні тіолові групи розташовуються в доступних сайтах антитіла і можуть застосовуватися для кон'югації антитіла з іншими фрагментами, наприклад фрагментами лікарського засобу або фрагментами лінкер-лікарський засіб, для створення імунокон'югата, описаного далі в цьому документі. Антитіла, сконструйовані з використанням цистеїну, можна одержати, як описано, наприклад, в патентах США №№ 7521541, 830930, 7855275, 9000130 або в заявці WO 2016040856.

7. Імунокон'югати

В даному винаході також запропоновані імунокон'югати, які містить запропоноване в даному документі антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, кон'юговане (хімічно зв'язане) з одним або більше терапевтичними засобами, такими як цитотоксичні засоби, хіміотерапевтичні засоби, лікарські препарати, інгібітори росту, токсини (наприклад, білкові токсини, ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження або їх фрагменти) або радіоактивні ізотопи.

В одному аспекті імунокон'югат представляє кон'югат антитіла-лікарського засобу (АЛЗ), в якому антитіло кон'юговане з одним або більше терапевтичними засобами, вказаними вище. Антитіло зазвичай сполучене з одним або більше терапевтичними агентами за допомогою лінкерів. Огляд технології АЛЗ, включно з прикладами терапевтичних агентів і лікарських засобів і лінкерів, наведено в Pharmacol Review 68:3-19 (2016).

Б. Рекомбінантні способи та композиції

Антитіла можуть бути одержані із застосуванням рекомбінантних способів і композицій, наприклад, як описано в US 4816567. Для цих способів представлена одна або більше виділених нуклеїнових кислот, які кодують антитіло.

В одному аспекті представлені виділені нуклеїнові кислоти, які кодують антитіло даного винаходу.

В одному аспекті запропонований спосіб одержання антитіла, яке зв'язується з VEGF

людини та IL-1бета людини, причому вказаний спосіб включає культивування клітини-хазяїна, яка містить нуклеїнову кислоту(и), яка кодує запропоноване вище антитіло, за умов, які придатні для експресії антитіла, і необов'язково виділення антитіла з клітини-хазяїна (або середовища, в якому культивують клітину-хазяїна).

5 Для рекомбінантного продукування антитіла, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, нуклеїнові кислоти, які кодують антитіло, наприклад, як описано вище, є виділеними та вставленими в один або більше векторів для подальшого клонування та/або експресії в клітині-хазяїні. Такі нуклеїнові кислоти легко виділяти та секвенувати, використовуючи традиційні процедури (наприклад, використовуючи олігонуклеотидні зонди, здатні специфічно зв'язуватись з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла), або одержувати рекомбінантними методами, або одержані хімічним синтезом.

10 Прийнятний носій і клітини-хазяї для клонування або експресії векторів, які кодують антитіла, включають прокаріотичні або еукаріотичні клітини, описані в цьому документі. Наприклад, антитіла можуть вироблятися в бактеріях, зокрема, якщо не потрібно глікозилювання та ефекторна функція Fc. Щодо експресії фрагментів антитіла та поліпептидів в бактеріях див., наприклад, патенти US 5648237, US 5789199 та US 5840523. (Див. також Charlton, K.A., в: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, (2003), pp. 245-254, де описана експресія фрагментів антитіла в *E. coli*). Після експресії антитіла можна виділити з маси бактеріальних клітин в розчинну фракцію і піддавати додатковому очищенню.

20 Клітини хребетних також можна використовувати як хазяїв. Наприклад, можна використовувати лінії клітин ссавців, які адаптовані для росту в суспензії. Інші приклади придатних ліній клітин-хазяїв ссавців являють собою лінію нирки мавпи CV1, трансформовану за допомогою SV40 (COS-7); лінію ембріональної нирки людини (клітини 293 або 293T, як описано, наприклад, в Graham F.L. et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977) 59-74); клітини нирки новонародженого хом'яка (BHK); клітини Сертолі миші (клітини TM4, як описано, наприклад, в Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23:(1980) 243-252); клітини нирки мавпи (CV1); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирки собаки (MDCK); клітини печінки пацюка лінії Buffalo (BRL 3A); клітини легень людини (W138); клітини печінки людини (Hep G2); пухлину молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, (як описано, наприклад, в Mather J.P. et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68); клітини MRC 5; і клітини FS4. Інші придатні лінії клітин-хазяїв ссавців включають клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), зокрема клітини DHFR-CHO (Urlaub G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220); та клітинні лінії мієломи Y0, NS0 і Sp2/0. Огляд деяких ліній клітин-хазяїв ссавців, придатних для продукування антитіл, див., наприклад, Yazaki, P. and Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

В одному аспекті клітина-хазяїн є еукаріотичною, наприклад клітиною яєчника китайського хом'яка (CHO) або лімфоїдною клітиною (наприклад, клітиною Y0, NS0, Sp20).

40 В. Фармацевтичні композиції

У додатковому аспекті запропоновані фармацевтичні композиції, які містять будь-яке з запропонованих в даному документі антитіл, наприклад, для застосування в будь-якому з нижченаведених терапевтичних способів. В одному аспекті фармацевтична композиція містить будь-яке з запропонованих в даному документі антитіл і фармацевтично прийнятний носій. В іншому аспекті фармацевтична композиція містить будь-яке з запропонованих в даному документі антитіл і щонайменше один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, як описано нижче.

50 Фармацевтичні композиції описаного в даному документі антитіла, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, готують шляхом змішування такого антитіла, яке має необхідний ступінь чистоти, з одним або більше необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями (Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії загалом є нетоксичними для реципієнтів у використовуваних дозуваннях та концентраціях та включають, але не обмежуються ними, буферні речовини, наприклад, гістидин, фосфат, цитрат, ацетат та інші органічні кислоти; антиоксиданти, зокрема аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (наприклад, хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію; хлорид бензетонію; фенол; бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, наприклад метил або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; і м-крезол); низькомолекулярні (містять менше 10 залишків) поліпептиди; білки, наприклад сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, наприклад

полівінілпіролідон; амінокислоти, наприклад гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, зокрема глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, наприклад ЕДТК; цукри, наприклад сахарозу, маніт, трегалозу або сорбіт; солеутворюючі протіоні, наприклад натрій; металовмісні комплекси (наприклад, комплекси Zn-білок) та/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, наприклад поліетилєнглїколь (ПЕГ). Типові фармацевтично прийнятні носії у цьому документі додатково включають дисперсійні агенти для поглинання лікарських засобів, наприклад розчинні нейтрально-активні глікопротеїни гіалуронїдази (sHASEGP), наприклад розчинні глікопротеїни гіалуронїдази людини PH-20, наприклад гHuPH20 (HYLENEX[®], Halozyme, Inc.). Деякі типові sHASEGP, зокрема гHuPH20, та способи використання описано в публікаціях патентів США №№ 2005/0260186 і 2006/0104968. В одному варіанті реалїзації sHASEGP об'єднують з однією або більше додатковими глікозамїногліканазами, наприклад, хондроїтиназами.

Типові композиції ліофілізованих антитїл описанї в патентї США № 6267958. Водні композиції антитїл включають описанї в патентї США № 6171586 та WO2006/044908, причому останнї композиції містять гістидин-ацетатний буфер.

Фармацевтична композиція за цим документом також може містити більше одного активного інгредїєнта, якщо це необхідно для конкретного показання, що підлягає лікуванню, переважно ті, які мають доповнювальні види активності та не чинять негативного впливу один на одного. Такі активні інгредїєнти прийнятно є присутніми в комбїнації в кількостях, які є ефективними для передбачуваної мети.

Активні інгредїєнти можна включати в мікрокапсули, одержанї, наприклад, за допомогою методик коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад мікрокапсули з гідроксиметилцелюлози або желатину та мікрокапсули з поліметилметакрилату, відповідно, в колоїдні системи доставлення лікарських засобів (наприклад, ліпосоми, альбумїновї мікросфери, мікроемульсії, наночастинки та нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методики розкритї у Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Фармацевтичні композиції для уповільненого вивільнення можна одержувати. Придатні приклади препаратів з уповільненим вивільненням включають напівпроникні матриці твердих гідрофобних полімерів, що містять антитїло, причому матриці являють собою вирїб певної форми, наприклад, плівки чи мікрокапсули.

Фармацевтичні композиції, призначенї для введення *in vivo*, зазвичай є стерильними. Стерильність можна легко забезпечити, наприклад, шляхом фільтрування через мембрани для стерильної фільтрації.

Г. Терапевтичні способи та шляхи введення

Будь-яке з антитїл, які зв'язуються з VEGF людини та IL-1бета людини, представленї в даному документі, можна використовувати в терапевтичних методах.

В одному аспекті представлене антитїло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, для застосування як лікарського препарату. В додаткових аспектах представлене антитїло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, для застосування в лікуванні судинного захворювання. У деяких аспектах представлене антитїло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, для застосування в способі лікування. У деяких аспектах цей винахід забезпечує антитїло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, для застосування в способі лікування індивїдуума, який має судинне захворювання, який включає введення індивїдууму ефективної кількості антитїла, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини. В одному такому аспекті спосїб додатково включає введення індивїдууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу (наприклад, одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти або шести додаткових терапевтичних засобів), наприклад, як описано нижче. В додаткових аспектах цей винахід забезпечує антитїло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, для застосування в інгїбуванні ангіогенезу. У деяких аспектах цей винахід забезпечує антитїло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, для застосування в способі інгїбування ангіогенезу в індивїдуумі, який включає введення індивїдууму ефективної кількості антитїла, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, для інгїбування ангіогенезу. "Індивїдуум" відповідно до будь-якого з наведених вище аспектів переважно являє собою людину.

В додаткових аспектах представлене антитїло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, для застосування в лікуванні захворювань очей. В одному варіанті реалїзації захворювання очей вибране з ВМД (в одному варіанті реалїзації вологої ВМД, сухої ВМД, проміжної ВМД, запущеної ВМД і географїчної атрофїї (ГА)), макулярної дегенерації, макулярного набряку, ДМН (в одному варіанті реалїзації фокального, нецентрального ДМО та дифузного, із залученням центрального відділу сітківки ДМН), ретинопатїї, діабетичної

ретинопатії (ДР) (в одному варіанті реалізації проліферативної ДР (ПДР), непроліферативної ДР (НПДР) і висотної ДР), інших зв'язаних з ішемією ретинопатій, РН, оклюзії вени сітківки (ОВС) (в одному варіанті реалізації форм, зв'язаних з центральною веною (ОЦВС) і гілками вени (ОГВС)), ХНВ (в одному варіанті реалізації міопічної ХНВ), неоваскуляризації рогівки, захворювань, зв'язаних з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризації сітківки, захворювань, зв'язаних з неоваскуляризацією сітківки/хоріоїдальною неоваскуляризацією, центральної серозної ретинопатії (ЦСР), патологічної міопії, хвороби Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу ока, СЕВРП, хвороби Коутса, хвороби Норрі, розладів сітківки, зв'язаних з синдромом остеопорозу-псевдогліоми (ОППГ), субкон'юнктивального крововиливу, почервоніння райдужної оболонки, неоваскулярного захворювання очей, неоваскулярної глаукоми, пігментного ретиніту (ПР), гіпертонічної ретинопатії, ангиоматозної проліферації сітківки, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужної оболонки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, кистозного макулярного набряку (КМН), васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, включаючи, окрім іншого, ЦМВ-ретиніт, меланому очей, бластому сітківки, кон'юнктивіт (в одному варіанті реалізації інфекційний кон'юнктивіт та неінфекційний (в одному варіанті реалізації алергічний) кон'юнктивіт), спадкового амаврозу Лебера (також відомого як спадковий амавроз Лебера або САЛ), увеїту (включаючи інфекційний та неінфекційний увеїт), хоріоїдиту (в одному варіанті реалізації мультифокального хоріоїдиту), гістоплазмозу очей, блефариту, синдрому сухого ока, травматичного ураження очей, хвороби Шегрена та інших офтальмологічних захворювань, причому захворювання або хвороба зв'язана з неоваскуляризацією очей, транссудацією та/або набряком сітківки або атрофією сітківки. В одному варіанті реалізації захворювання очей вибрано з ВМД (в одному варіанті реалізації вологої ВМД, сухої ВМД, проміжної ВМД, запущеної ВМД і географічної атрофії (ГА)), макулярної дегенерації, макулярного набряку, ДМН (в одному варіанті реалізації фокального, нецентрального ДМО і дифузного, із залученням центрального відділу сітківки ДМН), ретинопатії, діабетичної ретинопатії (ДР) (в одному варіанті реалізації проліферативної ДР (ПДР), непроліферативної ДР (НПДР) і висотної ДР.

У додатковому аспекті цей винахід забезпечує застосування антитіла, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, у виробництві або приготуванні лікарського засобу. В одному аспекті лікарський засіб призначений для лікування судинного захворювання. У додатковому аспекті лікарський засіб призначений для застосування в способі лікування захворювання, який включає введення індивідууму, який має судинне захворювання, ефективної кількості лікарського засобу. В одному такому аспекті вказаний спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу, наприклад, як описано нижче.

В одному аспекті препарат призначений для застосування в лікуванні захворювань очей. В одному аспекті лікарський засіб призначений для застосування в способі лікування захворювань очей, який включає введення індивідууму, який має захворювання очей, ефективної кількості лікарського засобу. В одному такому аспекті вказаний спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу, наприклад, як описано нижче.

У додатковому аспекті цей винахід пропонує спосіб лікування судинного захворювання. В одному аспекті спосіб включає введення індивідууму, який має таке судинне захворювання, ефективної кількості антитіла, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини. В одному такому аспекті вказаний спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу, як описано нижче.

В додатковому аспекті цей винахід забезпечує спосіб лікування захворювання очей. В одному аспекті спосіб включає введення індивідууму, який має таке захворювання очей, ефективної кількості антитіла, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини. В одному такому аспекті вказаний спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу, як описано нижче.

"Індивідуум" відповідно до будь-якого з вищевказаних аспектів може бути людиною.

У додатковому аспекті цей винахід забезпечує фармацевтичні композиції, які містять будь-яке з запропонованих у даному документі антитіл, які зв'язуються з VEGF людини та IL-1бета людини, наприклад, для застосування у будь-якому з вищевказаних терапевтичних способів. В одному аспекті фармацевтична композиція містить будь-яке з запропонованих у даному документі антитіл, які зв'язуються з VEGF людини та IL-1бета людини, і фармацевтично прийнятний носій. В іншому аспекті фармацевтична композиція містить будь-яке з запропонованих у даному документі антитіл, які зв'язуються з VEGF людини та IL-1бета людини, і щонайменше один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, як описано нижче.

Антитіла даного винаходу можна вводити окремо або використовувати в комбінованій терапії. Наприклад, комбінована терапія містить введення антитіла даного винаходу і введення щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу (наприклад, одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти або шести додаткових терапевтичних засобів).

5 Наприклад, в деяких варіантах реалізації будь-який з попередніх способів додатково включає введення однієї або більше додаткових сполук. У деяких варіантах реалізації запропоноване в даному документі антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, вводять одночасно з додатковою сполукою(ами). У деяких варіантах реалізації антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, вводять перед або після
10 додаткової сполуки(сполук). У деяких варіантах реалізації додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, вибраною з групи, яка складається з IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; ангіопоетину; Ang2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ та $\alpha5\beta1$; бетацелуліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNF α ; HtrA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білків, генетично зв'язаних з ризиком ВМД, таких як компоненти шляху комплементу C2, фактор В, фактор Н, CFHR3, C3b, C5, C5a та C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; інтерлейкін-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1 та TNFRSF10A. У деяких варіантах реалізації додаткова сполука являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент.

У деяких варіантах реалізації згідно з (або як застосовується до) будь-яким з вищевказаних варіантів реалізації розлад очей представляє внутрішньоочне неоваскуляризаційне захворювання, вибране з групи, яка складається з проліферативних ретинопатій, хоріоїдальної неоваскуляризації (ХНВ), вікової макулярної дегенерації (ВМД), діабетичної та інших зв'язаних з ішемією ретинопатій, діабетичного макулярного набряку, патологічної міопії, хвороби Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очей, оклюзії вени сітківки (ОВС), включаючи ОЦВС та ОГВС, неоваскуляризації рогівки, неоваскуляризації сітківки та ретинопатії недоношених (РН).
20

У деяких випадках представлено у даному документі антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, можна вводити в комбінації щонайменше з одним додатковим терапевтичним засобом для лікування розладу очей, наприклад, розладу очей, описаного в даному документі (наприклад, ВМД (наприклад, вологої ВМД), ДМН, ДР, ОВС або ГА). Типові додаткові терапевтичні засоби для комбінованої терапії для лікування розладів очей
25 включають, окрім іншого, антиангіогенні засоби, такі як антагоністи VEGF, включаючи, наприклад, антитіла до VEGF (наприклад, Fab до VEGF LUCENTIS® (ранібізумаб)), розчинні злиті білки рецепторів (наприклад, рекомбінантні розчинні злиті білки рецепторів EYLEA® (афліберцепт, також відомий як VEGF Trap Eye; Regeneron/Aventis)), аптамери (наприклад, пегильований аптамер до VEGF MACUGEN® (пегаптаніб натрію; NeXstar Pharmaceuticals/OSI Pharmaceuticals)) та інгібітори тирозинкінази VEGFR (наприклад, 4-(4-бром-2-фтораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси)хіназолін (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідін-1-ілпропокси)хіназолін (AZD2171), ваталаніб (РТК787), семаксамініб (SU5416); SUGEN) та SUTENT® (сунітиніб)); триптофаніл-тРНК-синтазу (TrpRS); скваламін; RETAANE® (ацетат анекортаву для суспензії депо, Alcon, Inc.); проліки комбретастатин А4 (СА4Р); MIFEPREX® (міфепристон-ru486); субтенон триамцинолону ацетонід; інтравітреальний кристалічний ацетонід триамцинолону; інгібітори матричної металопротеїнази (наприклад, Prinomastat (AG3340; Pfizer)); ацетонід флуоцинолону (включаючи внутрішньоочний імплант флуоцинолону; Bausch & Lomb/Control Delivery Systems); ліномід; інгібітори функції інтегрину $\beta3$; ангіостатин і їх комбінації. Ці та інші терапевтичні засоби, які можна вводити в комбінації з антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу описані,
30
35
40
45 наприклад, в заявці на патент США № US 2014/0017244, яка включена в цей документ посиланням у всій своїй повноті.

Додаткові приклади додаткових терапевтичних засобів, які можна використовувати в комбінації з представленим в даному документі антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА), включають, окрім іншого, VISUDYNE® (вертепорфін; лікарський засіб, що активується на світлі, який зазвичай використовують разом з фотодинамічною терапією з нетермічним лазером), РКС412, Endovion (NS 3728; NeuroSearch A/S), нейротрофічні фактори (наприклад, гліальний нейротрофічний фактор (GDNF) і ресничний нейротрофічний фактор (CNTF)), дилтіазем, дорзоламід, PHOTOTROP®, 9-цис-ретинальний, лікарський засіб для очей (наприклад, йодид фосфоліну, ехотіофат або інгібітори вуглецевої ангідази), веовастат (АЕ-941; АЕterna Laboratories, Inc.), Sirna-027 (AGF-745; Sima Therapeutics, Inc.), нейротрофіни (включаючи, тільки як приклад, NT-4/5, Genentech), Cand5 (Acuity Pharmaceuticals), INS-37217 (Inspire Pharmaceuticals), антагоністи інтегрину (включаючи з Jerini AG та Abbott Laboratories), EG-3306
50
55
60 (Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (BioDiem Ltd.), талідомід (як використовується, наприклад,

EntreMed, Inc.), кардіотрофін-1 (Genentech), 2-метоксіестрадіол (Allergan/Oculex), DL-8234 (Toray Industries), NTC-200 (Neurotech), тетратіомолібдат (Університет Мічигану), LYN-002 (Lynkeus Biotech), сполуки з мікрородоростей (Aquasearch/Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (Celltech Group plc), ATX-S10 (Hamamatsu Photonics), TGF-beta 2 (Genzyme/Celtrix), інгібітори тирозинкінази (наприклад, від Allergan, SUGEN або Pfizer), NX-278-L (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (OPTIS France SA), нейпропротектори гангліїв клітин сітківки (Cogent Neurosciences), похідні N-нітропіразолу (Texas A&M University System), KP-102 (Krenitsky Pharmaceuticals), циклоспорин А, терапевтичні засоби, які використовуються в фотодинамічній терапії (наприклад, VISUDYNE®; націлений на рецептор PDT, Bristol-Myers Squibb, Co.; порфимер натрію для ін'єкції з PDT; вертепорфін, QLT Inc.; ротапорфін з PDT, Miravent Medical Technologies; талапорфін натрію з PDT, Nippon Petroleum; і мотексафін лютецій, Pharmascylics, Inc.), антисенсові олігонуклеотиди (включаючи, як приклад, продукти, протестовані Novagalí Pharma SA та ISIS-13650, Ionis Pharmaceuticals) та їх комбінації.

Представлене в даному документі антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, можна вводити в комбінації з терапією або хірургічною процедурою для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА), включаючи, наприклад, лазерну фотокоагуляцію (наприклад, панретинальну фотокоагуляцію сітківки (ПФС)), лазерну обробку друз, хірургію макулярної діри, макулярну транслокаційну хірургію, мініатюрні телескопічні пристрої, що імплантуються, ангіографію PHI-motion (також відому як мікролазерна терапія і лікування живильних судин), терапію протонним пучком, мікростимуляційну терапію, хірургію відшарування сітківки та склоподібного тіла, пломбування склери, субмакулярну хірургію, транспупілярну термотерапію, терапію з використанням фотосистеми I, використання РНК-інтерференції (РНКі), екстракорпоральний реофорез (також відомий як мембранна диференційна фільтрація та реотерапія), імплантацію мікрочіпу, терапію стовбуровими клітинами, генно-замісну терапію, генну терапію з використанням рибозимів (включаючи генну терапію для чутливого до гіпоксії елемента, Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; і генну терапію PDEF, GenVec), трансплантацію фоторецепторів/клітин сітківки (включаючи епітеліальні клітини сітківки, що трансплантуються, Diacrin, Inc.; трансплантат клітин сітківки, наприклад, Astellas Pharma US, Inc., ReNeuron, CHA Biotech), акупунктуру і їх комбінації.

У деяких випадках антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, можна вводити в комбінації з антиангіогенним засобом для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА). Будь-який придатний антиангіогенний засіб можна використовувати в комбінації з антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу, включаючи, окрім іншого, перераховані в Carmeliet et al. Nature 407:249-257, 2000. У деяких варіантах реалізації антиангіогенний засіб являє собою антагоніст VEGF, включаючи, окрім іншого, антитіло до VEGF (наприклад, Fab до VEGF LUCENTIS® (ранібізумаб), RTH-258 (раніше ESBA-1008, одноланцюговий фрагмент антитіла до VEGF; Novartis), або біспецифічне антитіло до VEGF (наприклад, біспецифічне антитіло до VEGF/до ангіопоетину 2, таке як фарицимаб; Roche)), розчинний рекомбінантний злитий білок рецептора (наприклад, EYLEA® (афліберцепт)), варіант VEGF, розчинний фрагмент VEGFR, аптамер, здатний блокувати VEGF (наприклад, пегаптаніб) або VEGFR, нейтралізуюче антитіло до VEGFR, низькомолекулярний інгібітор тирозинкіназ VEGFR, DARPIn® до VEGF (наприклад, абіципар пегол, Molecular Partners AG/Allergan), малі інтерферуючі РНК, які інгібують експресію VEGF або VEGFR, інгібітор тирозинкіназ VEGFR (наприклад, 4-(4-бром-2-фтораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси)хіназолін (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідин-1-ілпропокси)хіназолін (AZD2171), ваталаніб (PTK787), семаксамініб (SU5416; SUGEN) та SUTENT® (сунітиніб)), і їх комбінації.

Інші придатні антиангіогенні засоби, які можна вводити в комбінації з представленим в даному документі антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА) включають кортикостероїди, ангіостатичні стероїди, ацетат анекортаву, агіостатин, ендостатин, інгібітори тирозинкінази, інгібітори матриксної металопротеїнази (ММР), білок, який зв'язує інсуліноподібний фактор росту 3 (IGFBP3), антагоністи фактора, одержаного зі строми (SDF-1), (наприклад, антитіла до SDF-1), фактор, одержаний з пігментного епітелію (PEDF), гамма-секретазу, дельта-подібний ліганд 4, антагоністи інтегрину, антагоністи фактора, який індукується гіпоксією (HIF)-1 α , антагоністи протеїнкінази СК2, засоби, які інгібують хоумінг стовбурових клітин (наприклад, ендотеліальних клітин-попередників) в сайт неоваскуляризації (наприклад, антитіло до антиваскулярного ендотеліального кадгерину (CD-144) та/або антитіло до SDF-1), та їх комбінації.

В додатковому прикладі в деяких випадках антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-

1 бета людини, та/або його полімерний препарат можна вводити в комбінації із засобом, який має активність проти неоваскуляризації, для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА), таким як протизапальний лікарський засіб, мішень ссавців для інгібітора рапаміцину (mTOR) (наприклад, рапаміцин, AFINITOR® (еверолімус) і TORISEL® (темсиролімус)), циклоспорин, антагоніст фактора некрозу пухлин (TNF) (наприклад, антитіло до TNF α або його антигензв'язувальний фрагмент (наприклад, інфліксимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол і голімумаб) або розчинний злитий білок рецептора (наприклад, етанерцепт)), засіб проти комплекменту, нестероїдний протизапальний засіб (NSAID) або їх комбінації.

У ще одному прикладі в деяких випадках антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, можна вводити в комбінації з засобом, який є нейропротектором і може потенційно знижувати прогресування сухої ВМД у вологу ВМД, наприклад, клас лікарських засобів, який називається "нейростероїди", який включає лікарські засоби, такі як дегідроепіандростерон (DHEA) (торгові назви: PRASTERA™ та FIDELIN®), сульфат дегідроепіандростерону і сульфат прегненолону.

Будь-який придатний терапевтичний засіб від ВМД можна вводити як додатковий терапевтичний засіб у комбінації з представленим у даному документі антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА), включаючи, окрім іншого, антагоніст VEGF, наприклад, антитіло до VEGF (наприклад, LUCENTIS® (ранібізумаб), RTH-258 (раніше ESBA-1008, одноланцюговий фрагмент антитіла до VEGF; Novartis), або біспецифічне антитіло до VEGF (наприклад, біспецифічне антитіло до VEGF/до ангіопоетину 2, таке як фарицимаб; Roche)), розчинний злитий білок рецептора VEGF (наприклад, EYLEA® (афліберцепт)), DARPIn® до VEGF (наприклад, абіципар пегол; Molecular Partners AG/Allergan), або аптамер до VEGF (наприклад, MACUGEN® (пегаптаніб натрію)); антагоніст фактора росту, одержаного з тромбоцитів (PDGF), наприклад, антитіло до PDGF, антитіло до PDGFR (наприклад, REGN2176-3), пегильований аптамер до PDGF-BB (наприклад, FOVISTA®; Ophthotech/Novartis), розчинний злитий білок рецептора PDGFR або подвійний антагоніст PDGF/VEGF (наприклад, низькомолекулярний інгібітор (наприклад, DE-120 (Santen) або X-82 (TyrogeneX)) або біспецифічне антитіло до PDGF/до VEGF)); VISUDYNE® (вертепорфін) у комбінації з фотодинамічною терапією; антиоксидант; антагоніст системи комплекменту, наприклад, антагоніст фактора комплекменту C5 (наприклад, низькомолекулярний інгібітор (наприклад, ARC-1905; Ophthotech) або антитіло до C5 (наприклад, LFG-316; Novartis), антагоніст пропердину (наприклад, антитіло до пропердину, наприклад, CLG-561; Alcon), або антагоніст фактора комплекменту D (наприклад, антитіло до фактора комплекменту D, наприклад, лампалізумаб; Roche)); С3-блокуючий пептид (наприклад, APL-2, Appellis); модифікатор циклу перетворень родопсину (наприклад, гідрохлорид еміксустату); скваламін (наприклад, OHR-102; Ohr Pharmaceutical); вітамінні та мінеральні добавки (наприклад, описані в дослідженні 1 (AREDS1); цинк та/або антиоксиданти) і дослідженні 2-х вікових захворювань очей (AREDS2; цинк, антиоксиданти, лютеїн, зеаксантин та/або омега-3 жирні кислоти)); клітинну терапію, наприклад, NT-501 (Renexus); PH-05206388 (Pfizer), трансплантацію клітин huCNS-SC (StemCells), CNTO-2476 (лінія стовбурових клітин пуповини; Janssen), OpRegen (суспензія клітин RPE; Cell Cure Neurosciences) або трансплантацію клітин MA09-hRPE (Ocata Therapeutics); антагоніст тканинного фактора (наприклад, h1-con1; Iconic Therapeutics); агоніст альфа-адренергичного рецептора (наприклад, тартрат бримонідину; Allergan); пептидну вакцину (наприклад, S-646240; Shionogi); антагоніст амілоїду-бета (наприклад, моноклональне антитіло до амілоїду-бета, наприклад, GSK-933776); антагоніст S1P (наприклад, антитіло до S1P, наприклад, iSONEP™; Lpath Inc); антагоніст ROBO4 (наприклад, антитіло до ROBO4, наприклад, DS-7080a; Daiichi Sankyo); лентивірусний вектор, який експресує ендостатин і ангіостатин (наприклад, RetinoStat); і будь-яку їх комбінацію. У деяких випадках терапевтичні засоби від ВМД (включаючи будь-які з попередніх терапевтичних засобів від ВМД) можуть бути складені разом. Наприклад, антитіло до PDGFR REGN2176-3 можна складати разом з афліберцептом (EYLEA®). У деяких випадках такий об'єднаний препарат можна вводити в комбінації з антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу. У деяких випадках розлад очей являє собою ВМД (наприклад, вологу ВМД).

Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу можна вводити у комбінації з LUCENTIS® (ранібізумабом) для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА). У деяких випадках розлад очей являє собою ВМД (наприклад, вологу ВМД). У деяких випадках розлад очей являє собою ГА.

Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу можна

вводити у комбінації з EYLEA® (афліберцепт) для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА). У деяких випадках розлад очей являє собою ВМД (наприклад, вологу ВМД). У деяких випадках розлад очей являє собою ГА.

5 Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу можна вводити у комбінації з MACUGEN® (пегаптаніб натрію) для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА). У деяких випадках розлад очей являє собою ВМД (наприклад, вологу ВМД). У деяких випадках розлад очей являє собою ГА.

10 Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу можна вводити у комбінації з VISUDYNE® (вертепорфін) у комбінації з фотодинамічною терапією для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА). У деяких випадках розлад очей являє собою ВМД (наприклад, вологу ВМД). У деяких випадках розлад очей являє собою ГА.

15 Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу можна вводити у комбінації з антагоністом PDGF для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА). Типові антагоністи PDGF, які можна використовувати у комбінації з антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу, включають антитіло до PDGF, антитіло до PDGFR, низькомолекулярний інгібітор (наприклад, скваламін), пегільований аптамер до PDGF-В, такий як FOVISTA® (E10030; Ophthotech/Novartis), або подвійний антагоніст PDGF/VEGF (наприклад, низькомолекулярний інгібітор (наприклад, DE-120 (Santen) або X-82 (TyrogeneX)) або біспецифічне антитіло до PDGF/до VEGF). Наприклад, FOVISTA®
20 можна вводити як допоміжну терапію з антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу. OHR-102 можна вводити у комбінації з антагоністами VEGF, такими як LUCENTIS® або EYLEA®. У деяких варіантах реалізації антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу можна вводити у комбінації з OHR-102,
25 LUCENTIS® та/або EYLEA®. У деяких випадках розлад очей являє собою ВМД (наприклад, вологу ВМД). У деяких випадках розлад очей являє собою ГА.

30 Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу можна вводити у комбінації з RTH-258 для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА). RTH-258 можна вводити, наприклад, за допомогою інтравітреальної ін'єкції або інфузії в око. У деяких випадках розлад очей являє собою ВМД (наприклад, вологу ВМД). У деяких випадках розлад очей являє собою ГА.

35 Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу можна вводити у комбінації з абіципаром пеголом для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА). У деяких випадках розлад очей являє собою ВМД (наприклад, вологу ВМД). У деяких випадках розлад очей являє собою ГА.

40 Будь-який терапевтичний засіб від ДМН та/або ДР можна вводити у комбінації з антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА), включаючи, окрім іншого, антагоніст VEGF (наприклад, LUCENTIS® або EYLEA®), кортикостероїд (наприклад, кортикостероїдний імплант (наприклад, OZURDEX® (інтравітреальний імплантат дексаметазону) або ILUVIEN® (інтравітреальний імплантат ацетоніду флуоцинолону)) або кортикостероїд, складений для введення інтравітреальною ін'єкцією (наприклад, ацетонід триамцинолону)), або їх комбінації. У деяких випадках розлад очей являє собою ДМН та/або ДР.

45 Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу можна вводити у комбінації з LUCENTIS® (ранібізумаб) для лікування ДМН та/або ДР (наприклад, НПДР або ПДР).

Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу можна вводити у комбінації з EYLEA® (афліберцепт) для лікування ДМН та/або ДР (наприклад, НПДР або ПДР).

50 Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу можна вводити у комбінації з OZURDEX® (інтравітреальний імплантат дексаметазону) для лікування ДМН та/або ДР.

55 Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу можна вводити у комбінації з ILUVIEN® (інтравітреальний імплантат дексаметазону) для лікування ДМН та/або ДР.

60 У деяких випадках схему лікування TAO/PRN або схему лікування TAE можна використовувати для введення терапевтичного засобу від ВМД (наприклад, ранібізумабу або афліберцепту) у комбінації з антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу та/або його полімерним препаратом. У деяких випадках розлад очей являє собою ВМД (наприклад, вологу ВМД). У деяких випадках розлад очей являє собою ГА.

Такі види комбінованої терапії, вказані вище, охоплюють комбіноване введення (при якому два або більше терапевтичних агенти включені в один і той же або окремі препарати) і роздільне введення, і в цьому випадку введення антитіла, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу може відбуватися до, одночасно та/або після введення

5 додаткового терапевтичного засобу або засобів. В одному варіанті реалізації введення антитіла, яке зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини, даного винаходу і введення додаткового терапевтичного засобу може розділяти приблизно один, два, три, чотири або п'ять місяців, або приблизно один, два або три тижні, або приблизно одна, дві, три, чотири, п'ять або шість діб.

10 Антитіло за винаходом (та будь-який додатковий терапевтичний агент) можна вводити будь-якими придатними способами, зокрема парентеральним, внутрішньолегеневим та інтраназальним, та, якщо бажано для місцевого лікування, вводити усередину уражених тканин. Парентеральні інфузії включають внутрішньов'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньоочеревинне або підшкірне введення. Введення можна здійснити будь-яким

15 відповідним шляхом, наприклад, шляхом ін'єкцій, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, частково в залежності від того, це являє собою короткочасне чи хронічне введення. У цьому документі передбачені різні схеми дозування, включаючи, але не обмежуючись цим, однократне або багаторазове введення в різні моменти часу, болюсне введення та імпульсну інфузію.

20 Антитіла за винаходом будуть виготовлені, дозовані та введені способом, який відповідає вимогам належної медичної практики. Чинники, які необхідно враховувати в цьому контексті, включають конкретне порушення, що підлягає лікуванню, конкретного ссавця, що підлягає лікуванню, клінічний стан окремого пацієнта, причину порушення, місце доставлення агента, спосіб введення, графік введення й інші чинники, відомі практикуючим лікарям. Антитіло необов'язково вводять у препарат з одним або більше агентами, які застосовуються на цей

25 момент для профілактики або лікування розладу, що обговорюється. Ефективна кількість таких інших агентів залежить від кількості антитіла, присутнього в фармацевтичній композиції, типу розладу або лікування та інших чинників, які обговорювалися вище. Інші агенти зазвичай застосовують в тих же дозуваннях і вводять за допомогою шляхів, описаних у цьому документі, або приблизно від 1 до 99 % від дозувань, описаних у цьому документі, або в будь-якому

30 дозуванні та будь-яким шляхом, який емпірично/клінічно визначений як придатний. Для профілактики або лікування захворювання придатне дозування антитіла за цим винаходом (при використанні окремо або в комбінації з одним або більше іншими додатковими терапевтичними агентами) буде залежати від типу захворювання, що підлягає лікуванню, типу антитіла, тяжкості та перебігу захворювання, незалежно від того, вводять антитіло з

35 профілактичною або терапевтичною метою, попередньої терапії, історії хвороби пацієнта і відповіді на антитіло та рішення лікаря. Антитіло вводять пацієнту придатним чином за один раз або протягом серії процедур. В залежності від типу та тяжкості захворювання початкове можливе дозування для введення пацієнту може становити від приблизно 1 мкг/кг до 15 мкг/кг (наприклад, 0,1 мкг/кг-10 мкг/кг) антитіла, наприклад за одне або більше окремих введень чи

40 безперервною інфузією. Одна типова добова доза може варіюватися від приблизно 1 мкг/кг до 100 мкг/кг або більше, залежно від чинників, згаданих вище. У разі повторних введень упродовж декількох діб або більше, залежно від стану, лікування в загальному випадку проводять до досягнення необхідної міри пригнічення симптомів захворювання. Одна типова доза антитіла знаходиться в діапазоні від приблизно 0,05 мкг/кг до приблизно 10 мкг/кг. Отже, пацієнту можна

45 вводити одну або більше доз, що становлять приблизно 0,5 мкг/кг, 2,0 мкг/кг, 4,0 мкг/кг або 10 мкг/кг (або будь-яку їх комбінацію). Такі дози можна вводити з інтервалами, наприклад, щотижня або кожні три тижні (наприклад, щоб пацієнт одержував від приблизно двох до приблизно двадцяти або, наприклад, приблизно шести доз антитіла). Можна вводити початкову більш високу дозу навантаження, за якою йде одна або більше менших доз. Ефективність такої терапії легко

50 контролювати за допомогою традиційних методик і аналізів.

Д. Готові вироби

В іншому аспекті винаходу запропоновано готовий виріб, що містить матеріали, які є ефективними для лікування, профілактики та/або діагностики порушень, описаних вище. Готовий виріб містить контейнер та етикетку або вкладиш в упаковку на або у поєднанні з

55 контейнером. Відповідні контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци, пакети з розчином для в/в введення тощо. Контейнери можуть бути утворені з різних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер утримує композицію, яка знаходиться сама по собі або комбінована з іншою композицією, ефективною для лікування, попередження та/або діагностики стану, та може мати стерильний порт доступу (наприклад, контейнер може являти собою мішок

60 для внутрішньовенного розчину або флакон, що має пробку, яка проколюється підшкірною

голкою для ін'єкцій). Щонайменше один активний агент в композиції являє собою антитіло за винаходом. На етикетці або вкладиші в упаковку зазначено, що композицію використовують для лікування вибраного патологічного стану. Крім того, готовий виріб може містити (а) перший контейнер з композицією, що міститься в ньому, причому композиція містить антитіло за винаходом; і (б) другий контейнер з композицією, що міститься в ньому, причому композиція містить додатковий цитотоксичний або інший терапевтичний агент. Готовий виріб у цьому аспекті даного винаходу може додатково містити вкладення в упакування, на якому зазначено, що композиції можна використовувати для лікування конкретного патологічного стану. В альтернативному або додатковому варіанті готовий виріб може додатково містити другий (або третій) контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, наприклад бактеріостатичну воду для ін'єкцій (БВДІ), фосфатно-сольовий буферний розчин, розчин Рінгера та розчин декстрози. Він також може містити інші матеріали, необхідні з комерційної та користувацької точки зору, включаючи інші буфери, розчинники, фільтри, голки та шприци.

3. Конкретні варіанти реалізації даного винаходу

Далі перераховані конкретні варіанти реалізації даного винаходу.

1. Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить паратоп VEGF та паратоп IL-1бета в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) та варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому паратоп VEGF містить амінокислотні залишки з CDR-H2, CDR-L1 та CDR-L3 антитіла, причому паратоп IL-1бета містить амінокислотні залишки з CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2 антитіла.

2. Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить паратоп VEGF та паратоп IL-1бета в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) та варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому пара варіабельного домену легкого ланцюга та варіабельного домену важкого ланцюга одночасно зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини.

3. Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить паратоп VEGF та паратоп IL-1бета в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) і варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому жодна з амінокислот, які містяться в паратопі VEGF, не міститься в паратопі IL-1бета.

4. Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить паратоп VEGF та паратоп IL-1бета в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) і варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому антитіло зв'язується з тим же епітопом на VEGF людини та з тим же епітопом на IL-1бета людини, що й антитіло з варіабельним доменом важкого ланцюга SEQ ID NO:11 та варіабельним доменом легкого ланцюга SEQ ID NO:12.

5. Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить паратоп VEGF та паратоп IL-1бета в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) і варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому

- паратоп VEGF містить амінокислотні залишки з CDR-H2, CDR-L1 та CDR-L3 антитіла, причому паратоп IL-1бета містить амінокислотні залишки з CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2 антитіла; та/або

- пара варіабельного домену легкого ланцюга та варіабельного домену важкого ланцюга одночасно зв'язується з VEGF людини та IL-1бета людини; та/або

- жодна з амінокислот, які містяться в паратопі VEGF, не міститься в паратопі IL-1бета; та/або

- антитіло зв'язується з тим самим епітопом на VEGF людини та з тим самим епітопом на IL-1бета людини, що й антитіло з варіабельним доменом важкого ланцюга з SEQ ID NO:11 та варіабельним доменом легкого ланцюга з SEQ ID NO:12; та/або

- Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF121 людини з KD менше 10 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, та (ii) з IL-1бета людини з KD менш ніж 30 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу; та/або

- Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації більше ніж 70 °C; та/або

- Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіювання світла; та/або

- зв'язування Fab-фрагмента антитіла з VEGF людини інгібує зв'язування VEGF з VEGFR2 з IC50 менше 50 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу; і причому зв'язування Fab-фрагмента антитіла з IL-1бета людини інгібує зв'язування IL-1бета з IL-1бетаR1 з IC50 менш ніж 30 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

6. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.

7. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1β людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.

8. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

9. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1β людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (і) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

10. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, яке містить домен VH, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 та D101, та домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 та Y96, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

11. Антитіло варіанту реалізації 10, яке містить

- паратоп VEGF, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66 та R83, і наступні амінокислотні залишки в домені VL: I2, Y27, W27a, S27c, S27d, E67, D68, Q69, R92, Y93, H94 та Y96; і

- паратоп IL-1β, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, K94, D95, V96, F98 та D101, і наступні амінокислотні залишки в домені VL: L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, Y91.

12. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1β людини, яке містить в одній парі домену VL та домену VH: (і) домен VH, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 та D101, та (ii) домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 та Y96, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

13. Антитіло варіанту реалізації 12, яке містить

- паратоп VEGF, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66 та R83, і наступні амінокислотні залишки в домені VL: I2, Y27, W27a, S27c, S27d, E67, D68, Q69, R92, Y93, H94 та Y96; і

- паратоп IL-1бета, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, K94, D95, V96, F98 та D101, і наступні амінокислотні залишки в домені VL: L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, Y91.

14. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12.

15. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11, причому домен VH містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 та D101; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12, причому домен VL містить амінокислотні залишки I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 та Y96, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

16. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12.

17. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11, причому домен VH містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, R66, R83 та K94; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12, причому домен VL містить амінокислотні залишки I2, Y49, G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

18. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12.

19. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 з до 15 амінокислотних замінів; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 з до 15 амінокислотних замінів.

20. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, яке містить (а) домен VH, який

містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 з до 15 амінокислотних заміни, причому амінокислотні заміни розташовані в положеннях 3-25, 36-49, 97-82с, 84-93 або 103-113 SEQ ID NO:11; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 з до 15 амінокислотних заміни, причому амінокислотні заміни розташовані в положеннях 1, 4, 6, 8-23, 35-48, 58-66, 70-88 або 98-107 SEQ ID NO:12, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

21. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 з до 15 амінокислотних заміни; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 з до 15 амінокислотних заміни.

22. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, і яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 з до 15 амінокислотних заміни; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 з до 15 амінокислотних заміни.

23. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, яке містить послідовність VH з SEQ ID NO:11 та послідовність VL з SEQ ID NO:12.

24. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить послідовність VH з SEQ ID NO:11 та послідовність VL з SEQ ID NO:12.

25. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, яке містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга SQ ID NO:20 та амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:19.

26. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга з SEQ ID NO:20 та амінокислотну послідовність легкого ланцюга з SEQ ID NO:19.

27. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, яке містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:18 та амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:19.

28. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга з SEQ ID NO:18 та амінокислотну послідовність легкого ланцюга з SEQ ID NO:19.

29. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, у якому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF121 людини з K_D менше 10 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, та (ii) з IL-1бета людини з K_D менш ніж 30 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

30. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) с VEGF121 людини з K_D менше 10 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, та (ii) з IL-1бета людини з K_D менш ніж 30 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

31. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF121 людини з

K_D менше 10 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, та (ii) з IL-1бета людини з K_D менш ніж 30 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

32. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF121 людини з K_D менше 10 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, та (ii) з IL-1бета людини з K_D менш ніж 30 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

33. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить в одній парі домену VH та VL: (i) домен VH, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 та D101, та (ii) домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 та Y96, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF121 людини з K_D менше 10 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, та (ii) з IL-1бета людини з K_D менш ніж 30 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

34. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12; причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF121 людини з K_D менше 10 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, та (ii) з IL-1бета людини з K_D менш ніж 30 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

35. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації більше ніж 70 °С.

36. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації більше ніж 70 °С.

37. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації більше ніж 70 °С.

38. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить

амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації більше ніж 70 °C.

5 39. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить в одній парі домену VH та VL: (i) домен VH, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 та D101, та (ii) домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 та Y96, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації більше ніж 70 °C.

10 40. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12; причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації більше ніж 70 °C.

15 41. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіяння світла.

20 42. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіяння світла.

25 43. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіяння світла.

30 44. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіяння світла.

35 45. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить в одній парі домену VH та VL: (i) домен VH, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 та D101, та (ii) домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 та Y96, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіяння світла.

40 46. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-

H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та (домен VL), який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12; причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіяння світла.

47. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, у якому зв'язування Fab-фрагмента антитіла з VEGF людини інгібує зв'язування VEGF з VEGFR2 з IC50 менше 50 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу; і причому зв'язування Fab-фрагмента антитіла з IL-1бета людини інгібує зв'язування IL-1бета з IL-1бетаR1 з IC50 менш ніж 30 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

48. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому зв'язування Fab-фрагмента антитіла з VEGF людини інгібує зв'язування VEGF з VEGFR2 з IC50 менше 50 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу; і причому зв'язування Fab-фрагмента антитіла з IL-1бета людини інгібує зв'язування IL-1бета з IL-1бетаR1 з IC50 менш ніж 30 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

49. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, і причому зв'язування Fab-фрагмента антитіла з IL-1бета людини інгібує зв'язування IL-1бета з IL-1бетаR1 з IC50 менш ніж 30 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

50. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28 та K30, (ii) FR3, який містить амінокислотні залишки R66, R83 та K94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, який містить амінокислотний залишок I2, (ii) FR2, який містить амінокислотний залишок Y49, (iii) FR3, який містить амінокислотні залишки G57, E67, D68 та Q69, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, і причому зв'язування Fab-фрагмента антитіла з IL-1бета людини інгібує зв'язування IL-1бета з IL-1бетаR1 з IC50 менш ніж 30 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

51. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, яке містить в одній парі домену VH та VL: (i) домен VH, який містить амінокислотні залишки E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 та D101, та (ii) домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 та Y96, причому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, і причому зв'язування Fab-фрагмента антитіла з IL-1бета людини інгібує зв'язування IL-1бета з IL-1бетаR1 з IC50 менш ніж 30 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

52. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:11; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:12; та причому

зв'язування Fab-фрагмента антитіла з IL-1бета людини інгібує зв'язування IL-1бета з IL-1бетаR1 з IC50 менш ніж 30 нМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

53. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, яке є моноклональним антитілом.

5 54. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, яке є фрагментом антитіла, який зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини.

55. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, причому антитіло є біспецифічним.

10 56. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, причому антитіло є Fab-фрагментом.

57. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, причому антитіло є фрагментом біспецифічного антитіла.

58. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів реалізації, причому антитіло є мультиспецифічним антитілом.

15 59. Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло за будь-яким з варіантів реалізації 1-58.

60. Клітина-хазяїн, яка містить нуклеїнову кислоту варіанту реалізації 59.

61. Експресійний вектор, який містить виділену нуклеїнову кислоту варіанту реалізації 61.

62. Спосіб одержання антитіла, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1бета людини, який включає культивування клітини-хазяїна варіанту реалізації 60 так, щоб одержати антитіло.

20 63. Спосіб варіанту реалізації 62, який додатково включає вилучення антитіла з клітини-хазяїна.

64. Антитіло, яке одержане способом варіанта реалізації 62 або 63.

65. Фармацевтичний препарат, який містить антитіло за будь-яким з варіантів реалізації 1-58 та фармацевтично прийнятний носій.

25 66. Антитіло за будь-яким з варіантів реалізації 1-58 для застосування як лікарського засобу.

67. Антитіло за будь-яким з варіантів реалізації 1-58 для застосування в лікуванні судинного захворювання.

68. Антитіло за будь-яким одним із варіантів реалізації 1-58 для застосування в лікуванні судинного захворювання очей.

30 69. Застосування антитіла за будь-яким з варіантів реалізації 1-58 або фармацевтичної композиції варіанта реалізації 65 у виробництві лікарського засобу.

70. Застосування антитіла за будь-яким з варіантів реалізації 1-58 або фармацевтичної композиції варіанта реалізації 65 у виробництві лікарського засобу для інгібування ангиогенезу.

35 71. Спосіб лікування індивідуума, який має судинне захворювання, який включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла за будь-яким з варіантів реалізації 1-58 або фармацевтичної композиції варіанта реалізації 65.

72. Спосіб лікування індивідуума, який має судинне захворювання очей, який включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла за будь-яким з варіантів реалізації 1-58 або фармацевтичної композиції варіанта реалізації 65.

40 73. Спосіб інгібування ангиогенезу в індивідуума, який включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла за будь-яким з варіантів реалізації 1-58 або фармацевтичної композиції за будь-яким з варіантів реалізації 65 для інгібування ангиогенезу.

ОПИС АМІНОКИСЛОТНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1	Домен VH 1HVL2.3 EQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGMVFSWNAMSWVRQAPGKGLEWVGSISPKG DHKYLNTKFIGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGFFDVWGQGLV TVSS
SEQ ID NO:2	Домен VL 1HVL2.3 AIYMHQEPSSLSASVGDRTITCHGSYWLSNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASYRIIG VPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYRYHPYTFGHGTKVEIKR
SEQ ID NO:3	H-CDR1 1HVL2.3 WNAMS
SEQ ID NO:4	H-CDR2 1HVL2.3 SISPKGDHKYLNTKFIG
SEQ ID NO:5	H-CDR3 1HVL2.3 DIGFFDV
SEQ ID NO:6	L-CDR1 1HVL2.3 HGSYWLSNYLA

SEQ ID NO:7	L-CDR2 1HVL2.3 DASYRII
SEQ ID NO:8	L-CDR3 1HVL2.3, 1HVL12.85, 1HVL5.15 та RO7200394 QQYRYHPYT
SEQ ID NO:9	Важкий ланцюг Fab-фрагменту 1HVL2.3 EQLVESGGGLVKPGGSLRLSAAAGMVFVSWNAMSWVRQAPGKGLEWVGSISPKG DHKYLNTKFIGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGFFDVGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
SEQ ID NO:10	легкий ланцюг Fab-фрагменту 1HVL2.3 AIYMHQEPSSLSASVGDRTITCHGSYWLSNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASYRIIG VPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYRYHPYTFGHGKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:11	Домен VH 1HVL12.85 та RO7200394 DEQLVESGGGLVKPGGSLRLSAAAGMVFVSWNAMSWVRQAPGKGLEWVGSISKK GDHKYLNTKFIGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDVGFDDIWGQGT LTVSS
SEQ ID NO:12	Домен VL 1HVL12.85 та RO7200394 AIYMHQEPSSLSASVGDRTITCHGSYWLSSLVAVYQQKPGKAPKLLIYDAKYKHL GVPSRFSGSKEDQEFTLTISSLQPEDFATYYCQQYRYHPYTFGHGKVEIK
SEQ ID NO:13	H-CDR1 1HVL12.85, 1HVL5.15 та RO7200394 WNDMS
SEQ ID NO:14	H-CDR2 1HVL12.85, 1HVL5.15 та RO7200394 SISKKGDHKYLNTKFIG
SEQ ID NO:15	H-CDR3 1HVL12.85, 1HVL5.15 та RO7200394 DVGFFDI
SEQ ID NO:16	L-CDR1 1HVL12.85 та RO7200394 HGSYWLSSLVA
SEQ ID NO:17	L-CDR2 1HVL12.85, 1HVL5.15 та RO7200394 DAKYKHL
SEQ ID NO:18	Важкий ланцюг Fab-фрагменту 1HVL12.85 DEQLVESGGGLVKPGGSLRLSAAAGMVFVSWNAMSWVRQAPGKGLEWVGSISKK GDHKYLNTKFIGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDVGFDDIWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
SEQ ID NO:19	легкий ланцюг Fab-фрагменту 1HVL12.85 та RO7200394 AIYMHQEPSSLSASVGDRTITCHGSYWLSSLVAVYQQKPGKAPKLLIYDAKYKHL GVPSRFSGSKEDQEFTLTISSLQPEDFATYYCQQYRYHPYTFGHGKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:20	Важкий ланцюг Fab-фрагменту RO7200394 (SEQ ID NO:19 з мутацією K196Q) DEQLVESGGGLVKPGGSLRLSAAAGMVFVSWNAMSWVRQAPGKGLEWVGSISKK GDHKYLNTKFIGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDVGFDDIWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
SEQ ID NO:21	Домен VH 1HVL5.15 DETLVESGGGLVKPGGSLRLSAAAGMVFVSWNAMSWVRQAPGKGLEWVGSISKK GDHKYLNTKFIGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDVGFDDIWGQGT LTVSS
SEQ ID NO:22	Домен VL 1HVL5.15 AIYMHQEPSSLSASVGDRTITCHGSYWLSSLVAVYQQKPGKAPKLLIYDAKYKHL GVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYRYHPYTFGHGKVEIK
SEQ ID NO:23	L-CDR1 1HVL5.15 HGSYWLSSLMA
SEQ ID NO:24	Важкий ланцюг Fab-фрагменту 1HVL5.15 DETLVESGGGLVKPGGSLRLSAAAGMVFVSWNAMSWVRQAPGKGLEWVGSISKK GDHKYLNTKFIGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDVGFDDIWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

SEQ ID NO:25	легкий ланцюг Fab-фрагменту 1HVL5.15 AIYMHQEPSSLSASVGDRTITCHGSYWLSSLMAWYQQKPGKAPKLLIYDAKYKHL GVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYRYHPYTFGHGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:26	VEGF людини MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAQWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHP IETLVDIFQEYFDEIEYIFKPCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQ GQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGGKQKRKRKKSRYKSWSVYV GARCCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLEFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELN ERTCRCDKPRR
SEQ ID NO:27	IL1beta людини MAEVPPELASEMMAYYSGNEDDLFFEADGPKQMKCSFQDLDLCPDGGIQLRISDHH YSKGFQRQAASVVVAMDKLRKMLVPCPQTFQENDLSTFFPFIFEEPIFFDWDNE

ПРИКЛАДИ

Наступні приклади представлені для допомоги у розумінні даного винаходу, справжній об'єм якого вказаний у доданій формулі винаходу. Зрозуміло, що модифікації можна зробити у вказаних процедурах без відхилення від суті даного винаходу.

Приклад 1:

Одержання Fab-фрагмента біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета

Fab-фрагмент біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета одержували шляхом незалежного скринінгу моноспецифічних антитіл, які зв'язуються з VEGF та IL-1бета, з паратопами, що не перекриваються, та наступного злиття амінокислотних послідовностей у біпаратопній парі VH/VL, яка зв'язується з VEGF та IL-1бета, способом, описаним раніше, наприклад, у WO 2012/163520.

Використовували дві окремі бібліотеки фагових дисплеїв синтетичних Fab-фрагментів, причому в першій бібліотеці фагових дисплеїв залишки в ділянках CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2 Fab-фрагментів були різними, і причому у другій бібліотеці фагових дисплеїв залишки в ділянках CDR-L1, CDR-L3 та CDR-H2 Fab-фрагментів були різними. В кожній бібліотеці інші три ділянки CDR підтримували недиверсифікованими як інваріантна фіктивна послідовність. В обох бібліотеках домен CH1 Fab-фрагментів був злитий за допомогою лінкера з усіченим білком гена-III для полегшення фагового дисплею.

Перша бібліотека була збагачена пов'язувачами проти IL-1бета людини, а друга бібліотека була збагачена пов'язувачами проти VEGF-A людини, шляхом пенінгу фагової бібліотеки. Після пенінгу мініпрепарати плазмід одержували для обох збагачених пулів фагемідних векторів. Мініпрепарати засвоювалися рестрикційним ферментом для видалення ділянки, яка кодує усічений білок гена-III, і повторно циркулювалися шляхом зшивання з одержанням пулів експресійних векторів, які кодують розчинні Fab-фрагменти, які були збагачені пов'язувачами IL-1бета або пов'язувачами VEGF-A, відповідно. Ці пули векторів перетворювали на клітини TG1 E.coli, і окремі колонії обирали та культивували для розчинної експресії окремих Fab-клонів на титраційному мікропланшеті. Супернатанти, які містять розчинні Fab-фрагменти, відбирали для зв'язування з IL-1бета або VEGF-A, використовуючи стандартні методи ІФА, і клони TG1, які дають специфічні пов'язувачі, піддавали дії препаратів плазмід ДНК і секвенуванню з одержанням пар послідовностей VH та VL, які специфічно зв'язуються або з IL-1бета, або з VEGF-A, відповідно.

Пару послідовностей VH та VL біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета розробляли in silico шляхом (1) заміни непридатних залишків VH 52b-65 в послідовності VH специфічного до IL-1бета Fab на вибрані залишки VH 52b-65 специфічного до VEGF-A Fab, таким чином заміщаючи залишки CDR-H2, які потенційно є частиною специфічного до VEGF-A паратопу, на важкий ланцюг зв'язувального IL-1бета, та (2) заміни непридатних залишків VL 49-57 в послідовності VL специфічного до VEGF-A Fab на вибрані залишки VL 49-57 специфічного до IL-1бета Fab, таким чином заміщаючи залишки CDR-L2, які є потенційно частиною специфічного до IL-1бета паратопу, на легкий ланцюг зв'язувального VEGF-A.

Приклад 2:

Експресія Fab-фрагмента біспецифічного антитіла 1HVL2.3 до VEGF/IL-1бета

Одержану розроблену пару послідовностей VH та VL біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета синтезували та клонували в експресійному векторі E.coli в рамці з генними послідовностями, які кодують домени CH1 та Скаппа. Вектор перетворювався в клітини TG1 E.coli, і окрему колонію культивували для розчинної експресії Fab-фрагмента біспецифічного

антитіла. Біспецифічне антитіло очищали від супернатанта культури TG1 шляхом афінної хроматографії, і перевіряли специфічне зв'язування як з IL-1бета, так і VEGF-A.

Біспецифічне антитіло "1HVL2.3" до VEGF/IL-1бета обирали, і воно характеризувалося важким ланцюгом з SEQ ID NO:9 і легким ланцюгом з SEQ ID NO:10.

5 Для подальших аналізів антитіла до VEGF/IL-1бета даного винаходу перетворювали в і експресували з клітин HEK293 стандартними рекомбінантними способами.

Приклад 3:

Визначення характеристик Fab-фрагмента біспецифічного антитіла 1HVL2.3 до VEGF/IL-1бета

10 Афінність зв'язування, гідрофільність та термічну стабільність біспецифічного антитіла 1HVL2.3 оцінювали наступним чином:

Кінетика зв'язування VEGF, оцінена за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР):

15 Захватне антитіло до His (GE Healthcare 28995056) іммобілізували на Sensor Chip C1 серії S (GE Healthcare 29104990), використовуючи стандартну хімію амінного зв'язування, що давало щільність поверхні приблизно 500 одиниць резонансу (ОР). Як рухомий буфер та буфер для розведення використовували HBS-P+ (10 мМ ГЕПЕС, 150 мМ NaCl, рН 7,4, 0,05 % сурфактанту P20). VEGF121-His людини захоплювався на поверхні з одержанням щільностей лігандів приблизно 10 та 20 ОР, відповідно. Послідовно вводили серійні розведення Fab-фрагмента біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета (1,2-100 нМ, розведення 1:3) протягом 90 с кожне, дисоціацію відстежували протягом 3600 с за швидкості потоку 30 мкл/хв (кінетика одного циклу). Поверхню регенерували шляхом введення 10 мМ гліцину з рН 1,5 протягом 60 с. Об'ємну різницю показника заломлення коригували шляхом віднімання контрольних введень і шляхом віднімання відповіді, одержаної від контрольної проточної комірки без іммобілізованого VEGF121 людини. Апроксимацію кривих проводили, використовуючи 1:1 модель зв'язування Ленгмюра в оцінному програмному забезпеченні Biacore. Для забезпечення більше надійної відповідності варіант Multiple Rmax обирали для загальної відповідності, використовуючи обидві щільності лігандів.

25 Кінетика зв'язування IL-1b, оцінена за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР):

30 Захватне антитіло до Fab (GE Healthcare 28958325) іммобілізували на Sensor Chip C1 серії S (GE Healthcare 29104990), використовуючи стандартну хімію амінного зв'язування, що давало щільність поверхні приблизно 500 одиниць резонансу (ОР). Fab-фрагмент біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета іммобілізували на поверхні з одержаними рівнями іммобілізації приблизно 20 ОР. Серійні розведення в діапазоні від 0,74 до 60 нМ (розведення 1:3) або IL-1бета людини (PerproTech 200-01B), або IL-1 бета яванського макака (Sino Biological 90010-CNAE) вводили протягом 90 с, дисоціацію відстежували протягом щонайменше 600 с за швидкості потоку 30 мкл/хв. Поверхню регенерували шляхом двох послідовних впорскувань 10 мМ гліцину з рН 2,1 протягом 60 с кожний. Об'ємну різницю показника заломлення коригували шляхом віднімання контрольних введень і шляхом віднімання відповіді, одержаної від контрольної проточної комірки без іммобілізованого Fab-фрагмента біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета. Апроксимацію кривих проводили, використовуючи 1:1 модель зв'язування Ленгмюра в оцінному програмному забезпеченні Biacore.

Хроматографія гідрофобної взаємодії (ХГВ):

45 Видиму гідрофобність визначали шляхом впорскування 20 мкг Fab-фрагмента біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета на колонку з HIC-ефір-5PW (Tosoh), урівноважену 25 мМ фосфатом Na, 1,5 М сульфатом амонію, рН 7,0. Елюювання проводили з лінійним градієнтом від 0 до 100 % буфера В (25 мМ фосфату Na, рН 7,0) протягом 60 хвилин. Час утримання порівнювали з білковими стандартами з відомою гідрофобністю.

50 Термічна стабільність:

Зразки Fab-фрагмента біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета готували в концентрації 1 мг/мл в 20 мМ суміші гістидину/хлориду гістидину, 140 мМ NaCl, рН 6,0, переносили в оптичний 384-лунковий планшет шляхом центрифугування через 0,4 мкм фільтрувальну пластину та покривали парафіновою оливою. Гідродинамічний радіус повторно вимірюють методом динамічного розсіяння світла на планшет-рідері DynaPro (Wyatt) під час нагрівання зразків зі швидкістю 0,05 °C/хв від 25 °C до 80 °C. В альтернативному варіанті зразки переносили в 10 мкл мікрокуветну матрицю та записували дані по статичному розсіянню світла, а також дані по флуоресценції після збудження лазером з 266 нм на інструменті Optim1000 (Avaca Inc.) під час нагрівання зі швидкістю 0,1 °C/хв від 25 °C до 90 °C.

60 Температуру початку агрегації визначали як температуру, за якої гідродинамічний радіус

(DLS) або інтенсивність розсіяного світла (Optim1000) починала підвищуватися. Температуру плавлення визначають як точку перегину на графіку залежності інтенсивності флуоресценції від довжини хвилі.

Результати наведені в таблицях 1 та 2.

5

Таблиця 1

Кінетика зв'язування 1HVL2.3 з VEGF та IL-1бета, що оцінено згідно з ППР

IL-1бета людини				VEGF 121 людини			
ka [1/Mc]	kd [1/c]	t1/2 [хв]	K _D [пМ]	ka [1/Mc]	kd [1/c]	t1/2 [хв]	K _D [пМ]
5,61E+06	2,56E-02	0,5	4565	1,75E+06	1,45E-05	796	8

Таблиця 2

Термічна стабільність та гідрофобність 1HVL2.3

Тар. (°C)	Тпл. (°C) DLS	НІС (відносний час утримання)
75 (+/-1)	87 (+/-1)	0,58

Приклад 4:

Покращення Fab-фрагмента біспецифічного антитіла 1HVL2.3 до VEGF/IL-1бета

10 Як показано вище, Fab-фрагмент біспецифічного антитіла 1HVL2.3 до VEGF/IL-1бета, яке є дуже стабільним, характеризується афінністю до IL-1бета в наномолярному діапазоні, а також значною гідрофобністю. Для лікування судинних захворювань очей, які потребують ін'єкції терапевтичного засобу в око, бажано забезпечувати терапевтичний засіб з високою афінністю до цільового антигену і у дуже високих концентраціях для збільшення тривалості

15 терапевтичного ефекту і для мінімізації незручностей для пацієнта. Для передбачуваної мети, таким чином, бажано збільшувати афінність і знижувати гідрофобність антитіла, щоб забезпечити розчинність у ізотонічному буфері у високих концентраціях.

Відповідно, для клінічного застосування антитіло потребувало додаткового покращення, наприклад, відносно зв'язування з IL-1бета (зокрема, шляхом збільшення швидкості дисоціації) і

20 зниження гідрофобності. Декілька циклів дозрівання проводили шляхом введення окремих амінокислотних замін в домен VH та VL. При дозріваннях кандидатні антитіла, одержані з антитіла 1HVL2.3, обирали та відбирали на основі їх бажаних властивостей відносно виходу, афінності, одночасного зв'язування з антигеном, гідрофільності, стабільності, в'язкості та інших параметрів.

25 Покращені кандидатні антитіла 1HVL5.15, 1HVL12.85 та RO7200394 обирали з багатьох протестованих молекул кандидатних антитіл. Амінокислотні послідовності цих покращених Fab-фрагментів біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета ідентифіковані в таблиці 3.

Таблиця 3

Амінокислотні послідовності Fab-фрагментів біспецифічних антитіл 1HVL2.3, 1HVL5.15, 1HVL12.85 та RO7200394 до VEGF/IL-1бета (числа стосуються SEQ ID NO при використанні в даному документі)

	VH	VL	важкий ланцюг	легкий ланцюг
1HVL2.3	1	2	9	10
1HVL5.15	21	22	24	25
1HVL12.85	11	12	18	19
RO7200394	11	12	20	19

30 Фігури 2 та 3 показують вирівнювання варіабельних доменів важкого ланцюга та варіабельних доменів легкого ланцюга одержаних Fab-фрагментів біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета. Нумерація положень амінокислот в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом. Для простоти нумерація включена на фігурі, додатково показуючи скелет і положення амінокислот CDR.

35 Приклад 5:

Кінетика зв'язування з антигеном покращених Fab-фрагментів біспецифічного антитіла до

VEGF/IL-1бета

Кінетику зв'язування з VEGF та IL-1бета для кандидатних антитіл оцінювали, як описано в прикладі 3, використовуючи вказані Fab-фрагменти біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета (амінокислотна послідовність, як показано в таблиці 3). Для порівняння показана кінетика зв'язування з антигеном антитіла 0032 до VEGF/IL-1бета рівня техніки, повнорозмірного антитіла IgG, розкритого в WO2016/075034.

Результати кінетики зв'язування з IL-1бета показані в таблиці 4 і таблиці 5.

Таблиця 4

Кінетика зв'язування з IL-1бета людини біспецифічних антитіл до VEGF/IL-1бета, оцінена за допомогою ППР (дані для антитіла 0032 рівня техніки з WO2016/075034)

Антитіло		IL-1бета людини			
		ka [1/Mc]	kd [1/c]	t1/2 [хв]	K _D [пМ]
0032	IgG	2,49E+06	3,05E-04	38	120
1HVL2.3	Fab	5,61E+06	2,56E-02	0,5	4565
1HVL5.15	Fab	1,66E+06	1,07E-04	109±13*	59±8*
1HVL12.85	Fab	4,76E+06	1,35E-04	86	28
RO7200394	Fab	4,73E+06	1,02E-04	114	21

*n=4

Таблиця 5

Кінетика зв'язування з IL-1бета яванського макака біспецифічних антитіл до VEGF/IL-1бета, оцінена за допомогою ППР

Антитіло		IL-1бета яванського макака			
		ka [1/Mc]	kd [1/c]	t1/2 [хв]	K _D [пМ]
1HVL2.3	Fab	3,14E+06	1,82E-02	0,6	5794
1HVL5.15	Fab	2,60E+06	1,18E-04	98	45
1HVL12.85	Fab	3,34E+06	6,54E-05	177	20
RO7200394	Fab	2,97E+06	7,94E-05	146	27

Кінетика зв'язування з IL-1бета інших часток і споріднених білків оцінювали для антитіл 1HVL5.15 та 1HVL12.85 за допомогою ППР, використовуючи таку саму експериментальну установку, як описано в прикладі 3. Не спостерігали жодного зв'язування відносно IL-1бета щурів, IL-1бета свиней, IL-1альфа людини і IL-1RA людини. Слабке зв'язування спостерігали відносно IL-1бета мишей і кроликів.

Результати для кінетики зв'язування з VEGF показані в таблиці 6.

Таблиця 6

Кінетика зв'язування з VEGF121 людини біспецифічних антитіл до VEGF/IL-1бета, оцінена за допомогою ППР (дані для антитіла 0032 рівня техніки з WO2016/075034)

Антитіло		VEGF121 людини			
		ka [1/Mc]	kd [1/c]	t1/2 [хв]	K _D [пМ]
0032	IgG	2,77E+04	<1E-06		< 100
1HVL2.3	Fab	1,75E+06	1,45E-05	796	8
1HVL5.15	Fab	1,53E+06	1,47E-05	789	10
1HVL12.85	Fab	2,50E+06	1,51E-05	764	6
RO7200394	Fab	2,85E+06	1,63E-05	707	6

Одночасне зв'язування з антигенами VEGF та IL-1бета кандидатних антитіл оцінювали наступним чином:

Захватне антитіло до His (GE Healthcare 28995056) іммобілізували на Sensor Chip C1 серії S (GE Healthcare 29104990), використовуючи стандартну хімію амінного зв'язування, що давало

щільність поверхні приблизно 500 одиниць резонансу (ОР). Як рухомий буфер та буфер для розведення використовували HBS-P+ (10 мМ ГЕПЕС, 150 мМ NaCl, pH 7,4, 0,05 % сурфактанту P20). VEGF121-His людини іммобілізували на поверхні з наступними ін'єкціями кандидатних антитіл і IL-1бета. Поверхню регенерували шляхом введення 10 мМ гліцину з pH 1,5 протягом 5
60 с. Об'ємну різницю показника заломлення коригували шляхом віднімання контрольних введень і шляхом віднімання відповіді, одержаної від контрольної проточної комірки без іммобілізованого VEGF121 людини.

Одночасне зв'язування кандидатних антитіл з VEGF та IL-1бета підтверджували для всіх покращених Fab-фрагментів біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета, тобто 1HVL5.15, 10
1HVL12.85 та RO7200394. Фігура 4 показує одночасне зв'язування антитіла 1HVL12.85 до VEGF/IL-1бета. Фігура 5 показує одночасне зв'язування антитіла RO7200394 до VEGF/IL-1бета.

Одночасне зв'язування з антигенами повнорозмірного антитіла 0032 IgG рівня техніки (WO 2016/075034) також оцінювали за допомогою такої самої експериментальної установки. Результати наведені на фігурі 6.

15 Приклад 6:

Інгібування зв'язування VEGF та IL-1бета з відповідними рецепторами

Аналіз інгібування рецепторів

Інгібування зв'язування VEGF та IL-1бета з їх відповідними рецепторами, hVEGFR2 та IL-1бетаR1, у присутності кандидатного антитіла RO7200394 (Fab-фрагмент) оцінювали, як
20 описано нижче. Для порівняння кінетику антитіла 0032 до VEGF/IL-1бета рівня техніки (повнорозмірного IgG), розкритого в WO2016/075034, також оцінювали.

hVEGFR2 (R&D Systems 357-KD) та IL-1bR1 (Sino Biological Inc. 10126-H02H) іммобілізували в різних проточних комірках для Sensor Chip CM5 серії S (GE Healthcare 29104988), використовуючи стандартну хімію амінного зв'язування, що давало щільності поверхні
25 приблизно 8000 та 20000 одиниць резонансу (ОР), відповідно. Як рухомий буфер та буфер для розведення використовували HBS-P+ (10 мМ ГЕПЕС, 150 мМ NaCl, pH 7,4, 0,05 % сурфактанту P20).

Для оцінки інгібування зв'язування з рецептором VEGF кінцеву концентрацію 200 нМ RO7200394 або 400 нМ антитіла 0032 попередньо інкубували з 50 нМ VEGF121. Для оцінки
30 інгібування зв'язування з рецептором IL-1бета кінцеву концентрацію 200 нМ RO7200394 або 200 нМ антитіла 0032 попередньо інкубували з 50 нМ IL-1бета. Зразки розводили (1:2) в відповідному розчині 50 нМ VEGF121 або IL-1бета.

Суміші антитіло/ліганд вводили на поверхню VEGFR2 або IL-1R1 протягом 60 с за швидкості потоку 5 мкл/хв. Після фази дисоціації протягом 60 с поверхню VEGFR2 регенерували шляхом
35 введення 5 мМ NaOH протягом 60 с, тоді як поверхню IL-1R1 регенерували шляхом введення 10 мМ гліцину з pH 3,0, а потім 5 мМ NaOH протягом 60 с кожний. Об'ємну різницю показника заломлення коригували шляхом віднімання контрольних введень і шляхом віднімання відповіді, одержаної від контрольної проточної комірки. Для оцінки відповідь зв'язування через 5 секунд після закінчення введення відбирали. одержану відповідь в ОР перетворювали у відповідь
40 зв'язування відносно початкового сигналу, який відповідає ліганду(ам) без антитіла. Значення IC50 розраховували за допомогою 4-параметричної логістичної моделі (XLfit, ID Business Solutions Ltd.)

Результати показані в таблиці 7 і таблиці 8; і на фігурі 7A (інгібування VEGFR2 у присутності антитіла RO7200394), фігурі 7B (інгібування VEGFR2 у присутності антитіла 0032), фігурі 8A
45 (інгібування IL-1R1 у присутності антитіла RO7200394) і фігурі 8B (інгібування IL-1R1 у присутності антитіла 0032).

Таблиця 7

Інгібування зв'язування з VEGFR2 біспецифічних антитіл до VEGF/IL-1бета без (- IL-1бета) або в присутності IL-1бета (+ IL-1бета)

Антитіло		IC50 (-IL-1бета)	IC50 (+IL-1бета)
0032	IgG	67 нМ	62 нМ
RO7200394	Fab	44 нМ	39 нМ

Інгібування зв'язування з IL-1бетаR1 біспецифічних антитіл до VEGF/IL-1бета без (- VEGF) або в присутності VEGF (+ VEGF)

Антитіло		IC50 (-VEGF)	IC50 (+VEGF)
0032	IgG	34 нМ	34 нМ
RO7200394	Fab	22 нМ	24 нМ

Показано, що зв'язування IL-1бета з Fab-фрагментом біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета даного винаходу не заважає інгібуванню взаємодії VEGF/VEGFR2. Також зв'язування VEGF з Fab-фрагментом біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета даного винаходу не заважає інгібуванню взаємодії IL-1бета/IL-1бетаR1.

Конкурентний ІФА для VEGF

Використовували наступні буфери: PBS (1x PBS pH 7,4); PBST (1x PBS, доповнений 0,1 % об./об. Tween-20); PBST 1 % BSA (PBST, доповнений 1 % BSA (розчин альбуміну бичачої сироватки 30 % від Sigma-Aldrich, A0336)); NaHCO₃ (розчин NaHCO₃, pH 9,4, одержаний від VupH Buffer Packs (ThermoScientific, 28382)); 2 % MPBST (PBST, доповнений 2 % (мас./об.) сухого знежиреного молока (Carl Roth, T145.3)).

96-Лункові планшети (Maxisorp Nunc-Immoplates) покривали 50 мкл/лунку rhVEGFR-1-Fc (R&D #321-FL-050) з кінцевою концентрацією 1 мкг/мл у 200 мМ NaHCO₃, pH 9,4 протягом 1 години при кімнатній температурі.

При цьому Fab-фрагменти антитіл з різними концентраціями попередньо інкубували з VEGF для одержання преміксу Fab антитіла-VEGF наступним чином: Серійні розведення Fab-фрагмента антитіла отримували шляхом додавання 280 мкл розчину Fab-фрагментів антитіла (409,6 нМ антитіла в PBST-1 % BSA) в лунках першого стовпчика круглодонного 96-лунокового планшета PS. Окремі лунки стовпчиків 2-12 того самого планшета заповнювали 140 мкл PBST-1 % BSA. Потім розведення 1:2 проводили шляхом перенесення 140 мкл розчину антитіла у наступний стовпчик, шляхом перемішування і продовження перенесення 140 мкл цього розбавленого розчину антитіла у наступний стовпчик. Це повторювали до стовпчика 11. Надлишок 140 мкл відкидали, щоб всі лунки містили 140 мкл. Стовпчик 12 слугував як контроль (пустий). Для попередньої інкубації з VEGF круглодонні 96-лункові планшети PS попередньо заповнювали 50 мкл/лунку 2 нМ розчину VEGF121 (Humanzyme, HZ-1206, Lot 0614-01) або 2 нМ VEGF165 (Humanzyme, HZ-1153, Lot 0716-01) в PBST-1 % BSA. 50 мкл серійних розведень відповідного Fab-фрагмента антитіла додавали в VEGF121 або VEGF165, відповідно; ретельно перемішували та інкубували протягом 1,5 годин при кімнатній температурі.

Покриті rhVEGFR-1-Fc планшети промивали двічі за допомогою PBST і блокували протягом 45 хв за допомогою 200 мкл 2 % MPBST. Після відмивання розчину MPBST двічі за допомогою PBST 50 мкл преміксу антитіла Fab-VEGF додавали на планшет і інкубували протягом 1,5 годин при кімнатній температурі. Потім планшети промивали двічі за допомогою PBST. Потім 50 мкл розчину, який містить біотинільоване антитіло до VEGF (R&D, BAF293; розведення 1:2000 в PBST) та SA-HRP (KPL, 14-30-00; розведення 1:2000 в PBST) додавали і інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Після 6х промивань за допомогою PBST 50 мкл розчину субстрату TMB (двокомпонентний субстрат HRP (KPL, 34021); який використовували при кімнатній температурі) додавали та інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. 50 мкл 1н H₂SO₄ додавали та поглинання зчитували при 450 нм.

Результати показані на фігурі 9 і фігурі 10, і показано покращення інгібування зв'язування з VEGF-R1 для 1HVL12.85 та RO7200394 відносно 1HVL2.3.

Приклад 7:

Біофізичні властивості покращених Fab-фрагментів біспецифічних антитіл до VEGF/IL-1бета (стабільність і гідрофобність)

Вказані біофізичні властивості кандидатних антитіл оцінювали, як описано в прикладі 3, використовуючи вказані Fab-фрагменти біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета (амінокислотна послідовність, як показано в таблиці 3).

Таблиця 9 показує термічну стабільність і гідрофобність антитіл, що аналізують. Для порівняння включена термічна стабільність антитіла 0032 до VEGF/IL-1бета рівня техніки, повнорозмірного антитіла IgG, розкритого в WO2016/075034. Хроматограми з HIC показані на фігурі 11 для Fab-фрагментів біспецифічних антитіл до VEGF/IL-1бета, а на фігурі 12 - для антитіла IgG 0032 до VEGF/IL-1бета рівня техніки.

Термічна стабільність і гідрофобність біспецифічних антитіл до VEGF/IL-1бета
(дані для антитіла 0032 рівня техніки з WO2016/075034)

Антитіло		Тар. (°C)	Тпл. (°C) DLS	НІС (відносний час утримання)
0032	IgG	55	62,5	0,81
1HVL2.3	Fab	75 (+/-1)	87 (+/-1)	0,58
1HVL12.85	Fab	73 (+/-1)	85 (+/-1)	0,03
RO7200394	Fab	73 (+/-1)	85 (+/-1)	0,04

Приклад 8:

5 Біофізичні властивості покращених Fab-фрагментів біспецифічних антитіл до VEGF/IL-1бета (динамічна в'язкість)

В'язкість кандидатних антитіл оцінювали наступним чином, використовуючи вказані Fab-фрагменти біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета (амінокислотна послідовність, як показано в таблиці 3):

10 В'язкість вимірювали за допомогою метода з латексною кулькою DLS, як описано раніше (He F et al.; Anal Biochem. 2010 Apr 1;399(1):141-3). Коротко, зразки концентрували до >200 мг/мл (на основі доступності матеріалу) за допомогою центрифужних концентраційних пристроїв, наприклад, Amicon Ultra – 0,5 мл фільтрувальні центрифуги, Ultracel – 10K, № за каталогом UFC501096.

15 Серійні розведення від приблизно 10 мг/мл до максимально можливої концентрації одержували та Polysorbate 20 та кульки (Nanosphere Size Standards, номінальний діаметр: 300 нм, 1 % твердих речовин, ThermoFisher № за каталогом 3300A) додавали до кінцевої концентрації 0,02 % (PS20) та 0,03 % (мас./мас., кульки), відповідно.

Невелику аліквоту цих зразків центрифугували протягом 1 хвилини при максимальній швидкості перед визначенням концентрації білка шляхом поглинання UV280.

20 Зразок, що залишився, переносили на оптичний 384-лунковий планшет, покривали шаром парафінової оливи для запобігання випаровуванню та дані DLS записували при вказаній температурі. З даних DLS для уявного гідродинамічного радіуса латексних кульок в'язкість розчину розраховували, як описано в He F et al.; вище. В'язкість при найвищій концентрації вказана в таблиці 10. Результати також показані на фігурі 13 (1HVL12.85) та фігурі 14
25 (RO7200394).

Таблиця 10

В'язкість біспецифічних антитіл до VEGF/IL-1бета при 15 °C

Антитіло		В'язкість
1HVL12.85	Fab	18,4 спз при 195 мг/мл
RO7200394	Fab	14,6 спз при 210 мг/мл

30 Результати показують, що антитіла даного винаходу можна складати у високій концентрації, яка містить в'язкість нижче придатної межі в'язкості для шприцювання, що становить до 30 спз. Хоча обидва тестових антитіла показали сильну здатність до концентрування, ефект більш очевидний для антитіла RO7200394.

35 Відповідно, антитіла даного винаходу є дуже придатними для застосувань для очей, оскільки вони забезпечують високу молярну дозу в обмеженому об'ємі ін'єкції, що при об'єднанні з високою активністю призводить до високого строку придатності та, відповідно, зниженої частоти дозування, що є бажаним для зниження складностей зі сторони пацієнта.

Приклад 9:

Хімічна стабільність покращеного Fab-фрагмента біспецифічного антитіла до VEGF/IL-1бета
Тест на хімічне розкладання:

40 Зразки антитіл складали у 20 мМ His/HisCl, 140 мМ NaCl, pH 6,0, і ділили на три аліквоти: одну аліквоту повторно буферизували в PBS, відповідно, і дві аліквоти зберігали в початковому препараті. Аліквоту в PBS і одну аліквоту в His/HisCl інкубували протягом 2 тижнів (2 тижні) при 40 °C (His/NaCl) або 37 °C (PBS) в 1 мг/мл, зразок в PBS інкубували додатково всього протягом

4 тижнів (4 тижні). Третій зразок контрольної аліквоти зберігали при -80 °С. Після закінчення інкубації зразки аналізували на відносну концентрацію активної речовини (Biacore; концентрація активної речовини обох підданих обробці аліквот кожного зв'язуючого нормалізували до не підданої обробці аліквоти при 4 °С), агрегацію (SEC) і фрагментування (капілярний електрофорез або SDS-PAGE) і порівнювали з необробленим контролем.

Активність зв'язування після обробки оцінювали наступним чином:

Захватне антитіло до Fab (GE Healthcare 28958325) іммобілізували на Sensor Chip CM5 серії S (GE Healthcare 29104988), використовуючи стандартну хімію амінного зв'язування, що давало щільність поверхні 4000-6000 одиниць резонансу (OP). Як рухомий буфер та буфер для розведення використовували HBS-P+ (10 мМ ГЕПЕС, 150 мМ NaCl, рН 7,4, 0,05 % сурфактанту P20). Антитіло 1HVL12.85 до VEGF/IL-1бета з концентрацією 2 мкг/мл вводили протягом 60 с за швидкості потоку 5 мкл/хв. HuVEGF121 (внутрішній препарат) або huIL-1 beta (Peprotech 200-01B) з концентрацією 2 мкг/мл кожний вводили протягом 60 с, дисоціацію спостерігали протягом 60 с за швидкості потоку 5 мкл/хв. Поверхню регенерували шляхом двох послідовних впорскувань 10 мМ гліцину з рН 2,1 протягом 60 с кожний. Об'ємну різницю показника заломлення коригували шляхом віднімання контрольних введення і шляхом віднімання відповіді, одержаної від контрольної проточної комірки. Для оцінки відповідь зв'язування через 5 секунд після закінчення введення відбирали. Для нормалізації сигналу зв'язування відповідь зв'язування з VEGF або IL-1 бета ділили на відповідь до Fab. Відносну концентрацію активної речовини розраховували шляхом прив'язування кожного зразка, який піддавався обробці при температурі, до відповідного зразка, який не піддавався обробці.

Результати наведені в Таблицях 11 та 12.

Таблиця 11

Активність зв'язування після обробки для антитіла 1HVL12.85 до VEGF/IL-1бета (амінокислотну послідовність дивіться в таблиці 3)

Умови обробки	Активність зв'язування після обробки з IL-1бета [% зв'язування]	Активність зв'язування після обробки з VEGF [% зв'язування]
2 тижні/ 40 °С / рН 6,0	98	98
2 тижні/ 37 °С / рН 7,4	98	96
4 тижні/ 40 °С / рН 6,0	97	95
4 тижні/ 37 °С / рН 7,4	97	94

Таблиця 12

Молекулярна цілісність після обробки для антитіла 1HVL12.85 до VEGF/IL-1бета (амінокислотну послідовність дивіться в таблиці 3)

Умови обробки	Агрегація [% агрегатів згідно з EXP]	Фрагментація [% фрагментів згідно з CE-SDS]
2 тижні/ 40 °С / рН 6,0	0,98	1,68
2 тижні/ 37 °С / рН 7,4	1,94	3,39

Приклад 10:

Структурний аналіз покращеного Fab-фрагмента біспецифічного антитіла 1HVL5.15 до VEGF/IL-1бета

Структурний аналіз Fab-фрагмента антитіла 1HVL5.15 до VEGF/IL-1бета проводили за допомогою рентгенокристалографії наступним чином:

Комплексоутворення і кристалізація третинного комплексу IL1 β -VEGF121-Fab 1HVL5.15

Для комплексоутворення Fab-фрагмент антитіла 1HVL5.15 та IL1 β людини (Peprotech) змішували в мольному відношенні 1:1,1. Після інкубації протягом 16 годин протягом ночі при 4 °С, VEGF121 людини (внутрішній препарат) додавали з одержанням третинного комплексу, який концентрували до 10 мг/мл. Випробування на початкову кристалізацію проводили при дифузії парів в сидячій краплі при 21 °С. Перші мікрочастинки виникали протягом 4 днів з 1,4М малонату натрію. Наступні експерименти на висіювання давали кристали з 0,1 М какодилату натрію рН 5,5, 0,1 М ацетату кальцію, 12 % PEG8000. Кристали безпосередньо збирали з планшета для відбору без будь-яких додаткових етапів оптимізації.

Збір даних та встановлення структури

Для збору даних кристали миттєво охолоджували при 100K в розчині осаджувача з додавання 15 % етиленгліколю як криопротектора. Дані дифракції збирали при довжині хвилі 1,0000 Å за допомогою детектора PILATUS 6M при каналі пучка X10SA Swiss Light Source (Villigen, Швейцарія). Дані обробляли за допомогою XDS (Kabsch, W. Acta Cryst. D66, 133-144 (2010)) і наносили на шкалу SADABS (BRUKER). Кристали належать до просторової групи C222₁ з всіма комірками a=177,97 Å, b=286,70 Å, c=105,39 Å, α=β=γ=90° і переломлюються для розподілення 2,97Å. Структуру визначали молекулярною заміною за допомогою PHASER (McCoey, A.J. et al. J. Appl. Cryst. 40, 658-674 (2007)), використовуючи координати зв'язаних внутрішніх структур Fab-фрагмента, IL1β та pdb вхідних даних 1МКК для VEGF як моделей пошуку. Програми з комплексу CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4 Acta Cryst. D50, 760-763 (1994)) і Buster (Bricogne, G., et al. (2011). Buster version 2.9.5 Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd) використовували для уточнення структури. Перегрупування вручну білка, використовуючи різницю електронної щільності, проводили за допомогою COOT (Emsley, P., et al. Acta Cryst D66, 486-501 (2010)). Збір даних і статистика уточнення наведені в таблиці 13. Всі графічні уявлення одержували за допомогою PYMOL (DeLano Scientific, Palo Alto, CA, 2002). Структуру аналізували за допомогою програми CONTACT з комплексу CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4 Acta Cryst. D50, 760-763 (1994)) для ідентифікації залишків паратопу та епітопу, використовуючи контактну відстань максимум 4 Å.

Таблиця 13

Збір даних і статистика уточнення структури (рентгенокристалографія)

Збір даних	
Довжина хвилі (Å)	1,0
Розподілення ¹ (Å)	49,76-2,97 (3,07-2,97)
Просторова група	C222 ₁
Елементарна комірка (Å, °)	177,97, 286,70, 105,39, 90°
Унікальні відбиття	55924 (5206)
Мультиплетність	7,60 (7,76)
Завершеність (%)	99,9 (99,9)
Середній I/σ (I)	6,53 (0,84)
R-meas	0,25 (0,93)
CC1/2	0,999 (0,297)
Уточнення	
Розподілення ¹ (Å)	49,76-2,97 (3,02-2,97)
Відбиття, які використовують при уточненні	55851 (2753)
Відбиття, які використовують для R-free	2595 (109)
R-work ³	0,204 (0,262)
R-free ⁴	0,252 (0,287)
Число атомів	10540
Білкові залишки	577
RMS-зв'язки (Å)	0,010
RMS-кути (°)	1,40
Переважає ділянка за картою Рамачандрана (%)	95,32
Повні маргінальні залишки за картою Рамачандрана (%)	0,15
Залишки ротамерів (%)	0,84
Clashscore	9,03
Середній B-фактор (Å ²)	72,98
білок	72,98

¹ Значення в інтервалі стосується найвищих комірок розподілення.

² $R_{злитий} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, де I представляє інтенсивність.

³ $R_{робочий} = \sum |F_o - \langle F_c \rangle| / \sum F_o$, де F_o представляє ту, що спостерігається, а F_c - розраховану амплітуду показника структури.

⁴ R_{вільний} розраховували на основі 5 % всіх даних, виключених при уточненні.

Амінокислотні залишки в контакті з відповідними антигенами, VEGF та IL-1бета,

ідентифікували з кристалічної структури Fab-фрагмента біспецифічного антитіла 1HVL5.15 до VEGF/IL-1бета в комплексі. Ілюстрація положення амінокислотних залишків паратопу в доменах VH та VL зображена на фігурі 2 та фігурі 3.

5 Амінокислоти з легкого ланцюга CDR1 та CDR3, а також важкого ланцюга CDR2 забезпечують паратоп VEGF. Паратоп VEGF не містить амінокислоти з легкого ланцюга CDR2, важкого ланцюга CDR1 і важкого ланцюга CDR3. Паратоп IL-1бета не містить амінокислоти з легкого ланцюга CDR2.

10 Амінокислотні залишки, визначені як такі, що приймають участь у зв'язуванні антигену, ідентифіковані в таблиці 14 (для амінокислотних залишків варіабельного домену важкого ланцюга) і таблиці 15 (для амінокислотних залишків варіабельного домену легкого ланцюга). Положення амінокислот представлені згідно з номерами в системі нумерації за Кабатом (таку ж нумерацію використовують на фігурах 2 та 3). Положення амінокислот, які залучені у зв'язування антигену, ідентифіковані за їх положенням за Кабатом у домені VH або VL (див. також нумерацію на фігурі 2 та 3).

15

Таблиця 14

Амінокислотні залишки варіабельного домену важкого ланцюга, які залучені у зв'язування антигену, як ідентифіковано за аналізом кристалічної структури біспецифічного антитіла 1HVL5.15 до VEGF/IL-1бета

VH	VEGF	IL-1бета
FR1	-	2, 26, 28, 30
H-CDR1	-	31, 35b, 35c
FR2	-	-
H-CDR2	55, 56, 58, 61, 62, 63, 64	52a
FR3	66, 83	94
H-CDR3	-	95, 96, 98, 101
FR4	-	-

Таблиця 15

Амінокислотні залишки варіабельного домену легкого ланцюга, які залучені у зв'язування антигену, як ідентифіковано за аналізом кристалічної структури біспецифічного антитіла 1HVL5.15 до VEGF/IL-1бета

VL	VEGF	IL-1бета
FR1	2	-
L-CDR1	27, 27a, 27c, 27d	32
FR2	-	49
L-CDR2	-	50, 53, 54, 56
FR3	67, 68, 69	57
L-CDR3	92, 93, 94, 96	91
FR4	-	-

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

20 <110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Антитіло, яке зв'язується з VEGF та IL-1бета, і способи застосування

<130> P35223 (MME)

25

<150> EP18215023.5

<151> 2018-12-21

<160> 27

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

5 <211> 115

<212>БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

10 <223> Домен VH 1HVL2.3

<400> 1

15 Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Met Val Phe Ser Trp Asn Ala
20 20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
35 40 45

25 Ser Ile Ser Pro Lys Gly Asp His Lys Tyr Leu Asn Thr Lys Phe Ile
50 55 60

30 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
35 85 90 95

Lys Asp Ile Gly Phe Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
40 100 105 110

Val Ser Ser
115

45 <210> 2

<211> 108

<212>БІЛОК

<213> Штучна послідовність

50

<220>

<223> Домен VL 1HVL2.3

<400> 2

5

Ala Ile Tyr Met His Gln Glu Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

10

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Gly Ser Tyr Trp Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

15

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Tyr Arg Ile Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

20

Ser Gly Ser His Glu Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

25

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Arg Tyr His Pro Tyr

85 90 95

30

Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 3

35

<211> 5

<212>БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

40

<223> H-CDR1 1HVL2.3

<400> 3

Trp Asn Ala Met Ser

45

1 5

<210> 4

<211> 17

50

<212>БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H-CDR2 1HVL2.3

5

<400> 4

Ser Ile Ser Pro Lys Gly Asp His Lys Tyr Leu Asn Thr Lys Phe Ile

1 5 10 15

10

Gly

15

<210> 5

<211> 7

<212>БЛОК

<213> Штучна послідовність

20

<220>

<223> H-CDR3 1HVL2.3

<400> 5

25

Asp Ile Gly Phe Phe Asp Val

1 5

30

<210> 6

<211> 11

<212>БЛОК

<213> Штучна послідовність

35

<220>

<223> L-CDR1 1HVL2.3

<400> 6

40

His Gly Ser Tyr Trp Leu Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

45

<210> 7

<211> 7

<212>БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

50

<223> L-CDR2 1HVL2.3

<400> 7

Asp Ala Ser Tyr Arg Ile Ile
 5 1 5

<210> 8

<211> 9

10 <212>БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

15 <223> L-CDR3 1HVL2.3, 1HVL12.85, 1HVL5.15 та RO7200394

<400> 8

Gln Gln Tyr Arg Tyr His Pro Tyr Thr
 20 1 5

<210> 9

<211> 223

<212>БЛОК

25 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг Fab-фрагмента 1HVL2.3

30 <400> 9

Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15

35

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Met Val Phe Ser Trp Asn Ala
 20 25 30

40

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 35 40 45

45

Ser Ile Ser Pro Lys Gly Asp His Lys Tyr Leu Asn Thr Lys Phe Ile
 50 55 60

50

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

5 Lys Asp Ile Gly Phe Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

10 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

15 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

20 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

25 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

30 Thr Lys Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

35 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

<210> 10

<211> 214

40 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> легкий ланцюг Fab-фрагмента 1HVL2.3

45

<400> 10

Ala Ile Tyr Met His Gln Glu Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

50

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Gly Ser Tyr Trp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30

5

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

10

Tyr Asp Ala Ser Tyr Arg Ile Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

15

Ser Gly Ser His Glu Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

20

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Arg Tyr His Pro Tyr
 85 90 95

25

Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

30

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

35

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

40

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

45

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

50

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

55

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

60

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 11
 5 <211> 116
 <212>БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 10 <223> домен VH 1HVL12.85 та RO7200394

 <400> 11

 Asp Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 15 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Glu Gly Met Val Phe Lys Trp Asn
 20 20 25 30

 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 25 35 40 45

 Gly Ser Ile Ser Lys Lys Gly Asp His Lys Tyr Leu Asn Thr Lys Phe
 50 55 60

 30 Ile Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Glu Lys Asp Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35 85 90 95

 Ala Lys Asp Val Gly Phe Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 40 100 105 110

 Thr Val Ser Ser
 115

 45 <210> 12
 <211> 107
 <212>БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 50

<220>

<223> домен VL 1HVL12.85 та RO7200394

<400> 12

5

Ala Ile Tyr Met His Gln Glu Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

10

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Gly Ser Tyr Trp Leu Ser Ser Leu
 20 25 30

15

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

20

Tyr Asp Ala Lys Tyr Lys His Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Lys Glu Asp Gln Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

25

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Arg Tyr His Pro Tyr
 85 90 95

30

Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13

35

<211> 5

<212>БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

40

<223> H-CDR1 1HVL12.85, 1HVL5.15 та RO7200394

<400> 13

45

Trp Asn Asp Met Ser
1 5

<210> 14

<211> 17

50

<212>БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H-CDR2 1HVL12.85, 1HVL5.15 та RO7200394

5

<400> 14

Ser Ile Ser Lys Lys Gly Asp His Lys Tyr Leu Asn Thr Lys Phe Ile

1 5 10 15

10

Gly

15

<210> 15

<211> 7

<212>БЛОК

<213> Штучна послідовність

20

<220>

<223> H-CDR3 1HVL12.85, 1HVL5.15 та RO7200394

<400> 15

25

Asp Val Gly Phe Phe Asp Ile

1 5

30

<210> 16

<211> 11

<212>БЛОК

<213> Штучна послідовність

35

<220>

<223> L-CDR1 1HVL12.85 та RO7200394

<400> 16

40

His Gly Ser Tyr Trp Leu Ser Ser Leu Val Ala

1 5 10

45

<210> 17

<211> 7

<212>БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

50

<223> L-CDR2 1HVL12.85, 1HVL5.15 та RO7200394

<400> 17

5 Asp Ala Lys Tyr Lys His Leu
1 5

<210> 18

<211> 224

10 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг Fab-фрагмента 1HVL12.85

15

<400> 18

Asp Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

20

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Glu Gly Met Val Phe Lys Trp Asn
20 25 30

25

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

30

Gly Ser Ile Ser Lys Lys Gly Asp His Lys Tyr Leu Asn Thr Lys Phe
50 55 60

35

Ile Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Glu Lys Asp Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

40

Ala Lys Asp Val Gly Phe Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

45

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

50

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

5 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

10 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

15 Gly Thr Lys Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

20 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

<210> 19
 25 <211> 214
 <212>БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 30 <223>важкий ланцюг Fab-фрагмента IHVL12.85 та RO7200394

<400> 19

35 Ala Ile Tyr Met His Gln Glu Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Gly Ser Tyr Trp Leu Ser Ser Leu
 20 25 30

40 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

45 Tyr Asp Ala Lys Tyr Lys His Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

50 Ser Lys Glu Asp Gln Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

Asp Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Glu Gly Met Val Phe Lys Trp Asn
 20 25 30

10 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

15 Gly Ser Ile Ser Lys Lys Gly Asp His Lys Tyr Leu Asn Thr Lys Phe
 50 55 60

20 Ile Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Glu Lys Asp Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

30 Ala Lys Asp Val Gly Phe Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

35 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

40 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

45 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

50 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

55 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

60 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 5
 <210> 21
 <211> 116
 <212>БІЛОК
 10 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223>домен VH 1HVL5.15
 15 <400> 21
 Asp Glu Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Glu Gly Met Val Phe Lys Trp Asn
 20 25 30
 25 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 30 Gly Ser Ile Ser Lys Lys Gly Asp His Lys Tyr Leu Asn Thr Lys Phe
 50 55 60
 Ile Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Glu Lys Asp Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 35
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 40 Ala Lys Asp Val Gly Phe Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 45 Thr Val Ser Ser
 115
 50 <210> 22
 <211> 107

<212>БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

5 <223>домен VL 1HVL5.15

<400> 22

Ala Ile Tyr Met His Gln Glu Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
10 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Gly Ser Tyr Trp Leu Ser Ser Leu
15 20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
20 35 40 45

Tyr Asp Ala Lys Tyr Lys His Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

25 Ser Gly Ser His Glu Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Arg Tyr His Pro Tyr
30 85 90 95

Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
35 100 105

<210> 23

<211> 11

<212>БЛОК

40 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> L-CDR1 1HVL5.15

45 <400> 23

His Gly Ser Tyr Trp Leu Ser Ser Leu Met Ala
1 5 10

50

<210> 24

<211> 224

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

5

<220>

<223> важкий ланцюг Fab-фрагмента 1HVL5.15

<400> 24

10

Asp Glu Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Glu Gly Met Val Phe Lys Trp Asn
 20 25 30

20

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

25

Gly Ser Ile Ser Lys Lys Gly Asp His Lys Tyr Leu Asn Thr Lys Phe
 50 55 60

30

Ile Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Glu Lys Asp Thr Leu Tyr
65 70 75 80

35

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

40

Ala Lys Asp Val Gly Phe Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

45

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

50

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

5 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

10 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

15 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

<210> 25

<211> 214

<212>БІЛОК

20 <213> Штучна послідовність

<220>

<223>легкий ланцюг Fab-фрагмента 1HVL5.15

25 <400> 25

Ala Ile Tyr Met His Gln Glu Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Gly Ser Tyr Trp Leu Ser Ser Leu
 20 25 30

35 Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

40 Tyr Asp Ala Lys Tyr Lys His Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

45 Ser Gly Ser His Glu Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Arg Tyr His Pro Tyr
 85 90 95

50

Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

5 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

10 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

15 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

20 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

25 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

30 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 26

<211> 232

35 <212>BIJOK

<213> Homo sapiens

<400> 26

40 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

45 Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30

50 Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60

5

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65 70 75 80

10

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95

15

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110

20

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125

25

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
 130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
 145 150 155 160

30

Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp
 165 170 175

35

Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys
 180 185 190

40

His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn
 195 200 205

Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr
 210 215 220

45

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 225 230

50

<210> 27

<211> 111
 <212> БІЛОК
 <213> Homo sapiens

5 <400> 27

Met Ala Glu Val Pro Glu Leu Ala Ser Glu Met Met Ala Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15

10

Gly Asn Glu Asp Asp Leu Phe Phe Glu Ala Asp Gly Pro Lys Gln Met
 20 25 30

15

Lys Cys Ser Phe Gln Asp Leu Asp Leu Cys Pro Leu Asp Gly Gly Ile
 35 40 45

20

Gln Leu Arg Ile Ser Asp His His Tyr Ser Lys Gly Phe Arg Gln Ala
 50 55 60

25

Ala Ser Val Val Val Ala Met Asp Lys Leu Arg Lys Met Leu Val Pro
 65 70 75 80

Cys Pro Gln Thr Phe Gln Glu Asn Asp Leu Ser Thr Phe Phe Pro Phe
 85 90 95

30

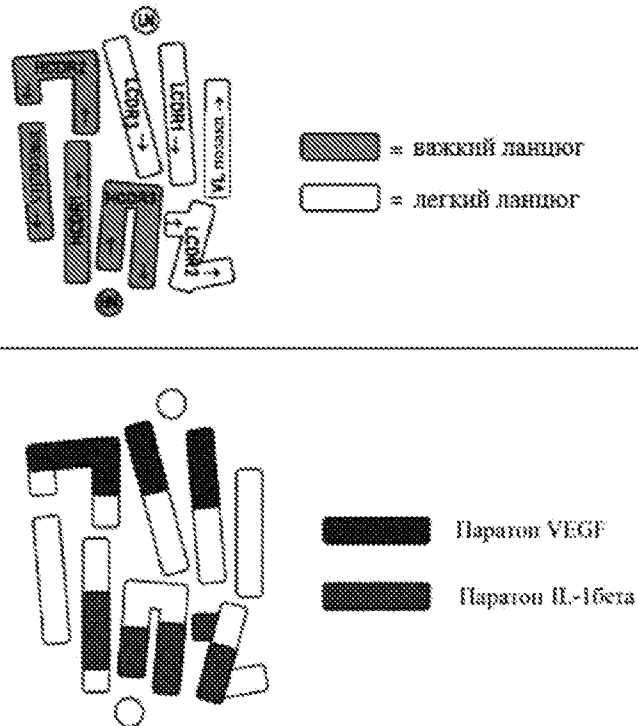
Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Phe Phe Asp Thr Trp Asp Asn Glu
 100 105 110

35

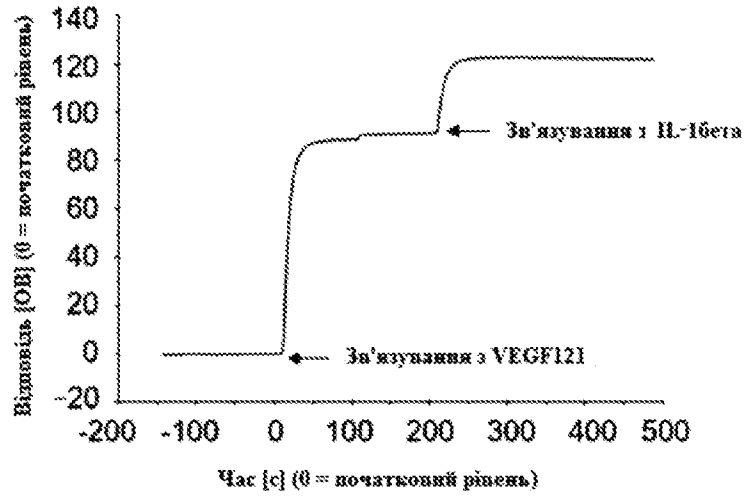
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1 бета людини, містить паратоп VEGF та паратоп IL-1 бета в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) та варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому паратоп VEGF містить амінокислотні залишки з CDR-H2, CDR-L1 та CDR-L3 антитіла, причому паратоп IL-1 бета містить амінокислотні залишки з CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2 антитіла, де антитіло містить послідовність VH з SEQ ID NO: 11 та послідовність VL з SEQ ID NO: 12.
2. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF людини та з IL-1 бета людини, містить послідовність VH з SEQ ID NO: 11 та послідовність VL з SEQ ID NO: 12.
3. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, яке містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга з SEQ ID NO: 20 і амінокислотну послідовність легкого ланцюга з SEQ ID NO: 19.
4. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, у якому Fab-фрагмент антитіла зв'язується з:
 - (i) VEGF121 людини з K_D менше ніж 10 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, та
 - (ii) IL-1 бета людини з K_D менше ніж 30 пМ, що вимірюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.
5. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації більше ніж 70 °C.

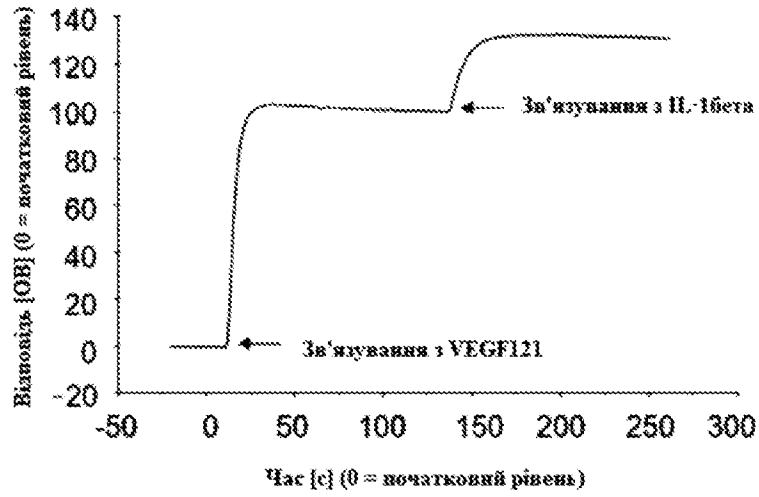
6. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °С, що вимірюється за допомогою динамічного розсіяння світла.
7. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, причому антитіло є фрагментом біспецифічного антитіла.
- 5 8. Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло за будь-яким з пп. 1-7.
9. Клітина-хазяїн, яка містить нуклеїнову кислоту за п. 8.
10. Експресійний вектор, який містить виділену нуклеїнову кислоту за п. 8.
11. Спосіб одержання антитіла, яке зв'язується з VEGF людини та з IL-1 бета людини, який включає культивування клітини-хазяїна за п. 9 так, щоб одержати антитіло.



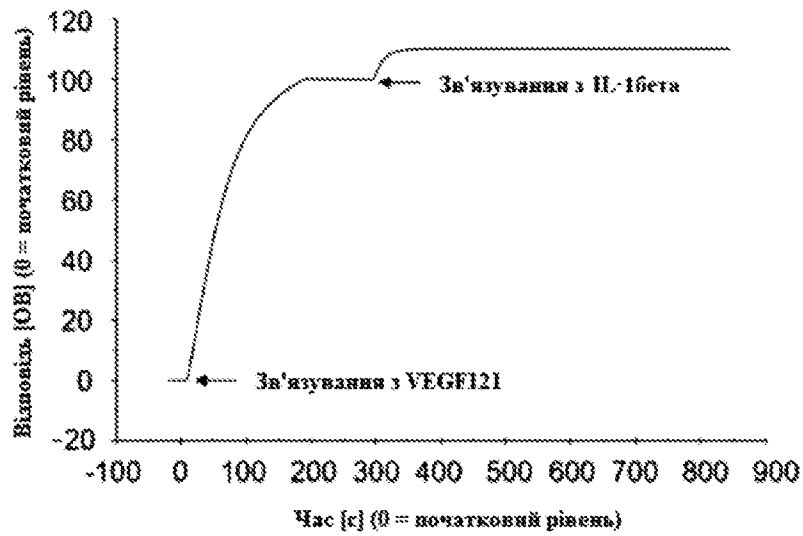
Фіг. 1



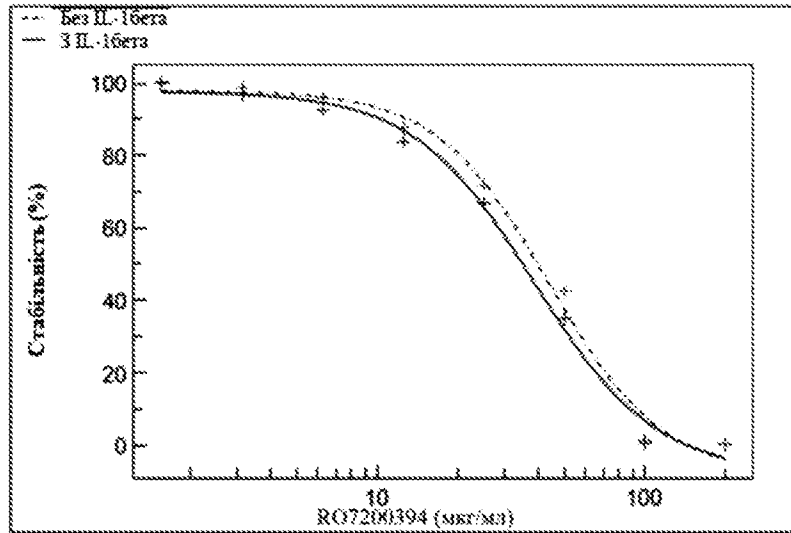
Фіг. 4



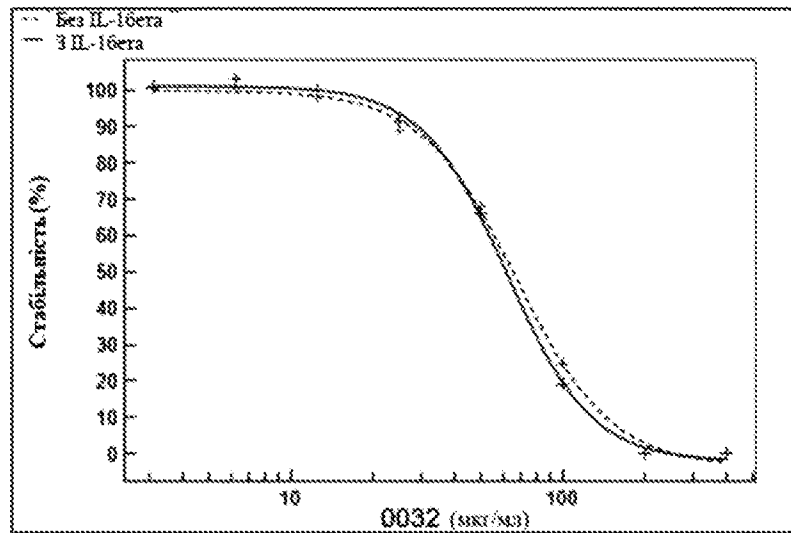
Фіг. 5



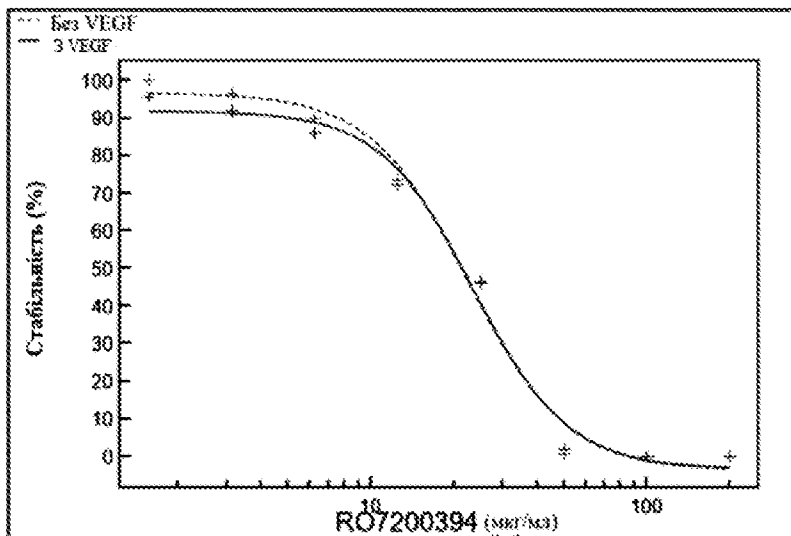
Фіг. 6



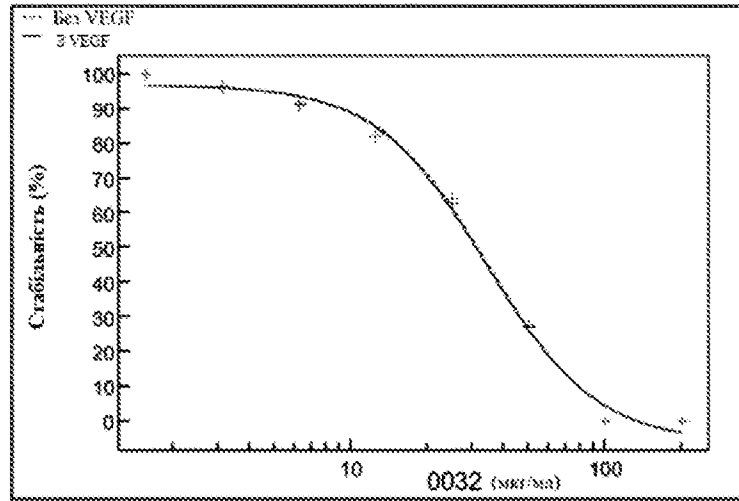
Фиг. 7А



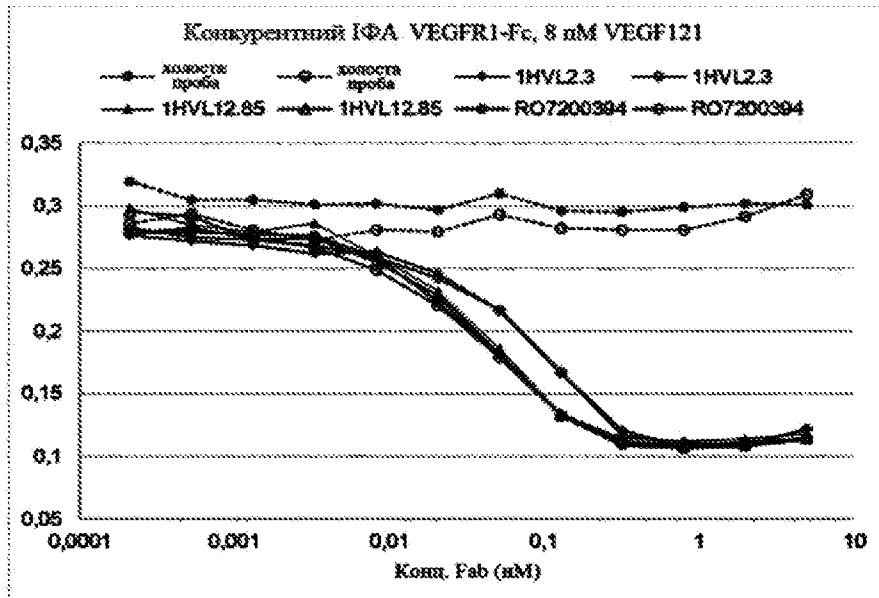
Фиг. 7Б



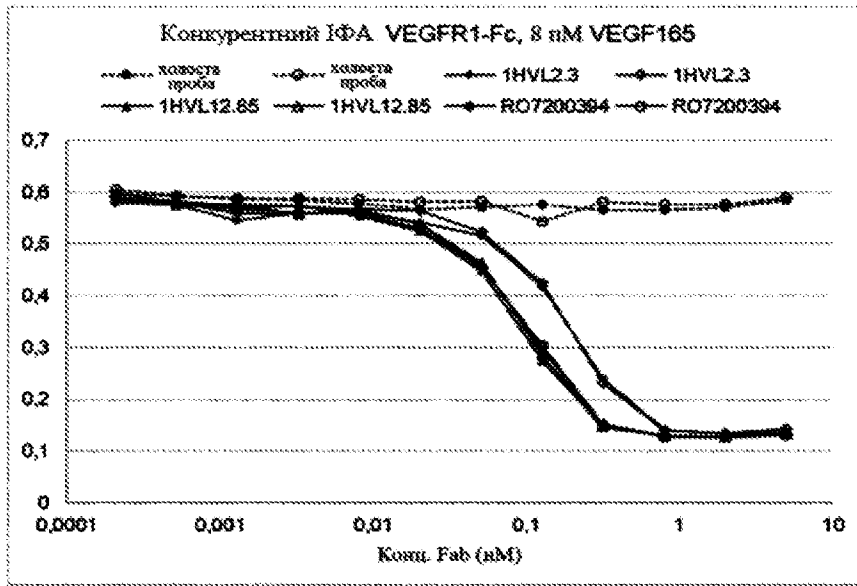
Фиг. 8А



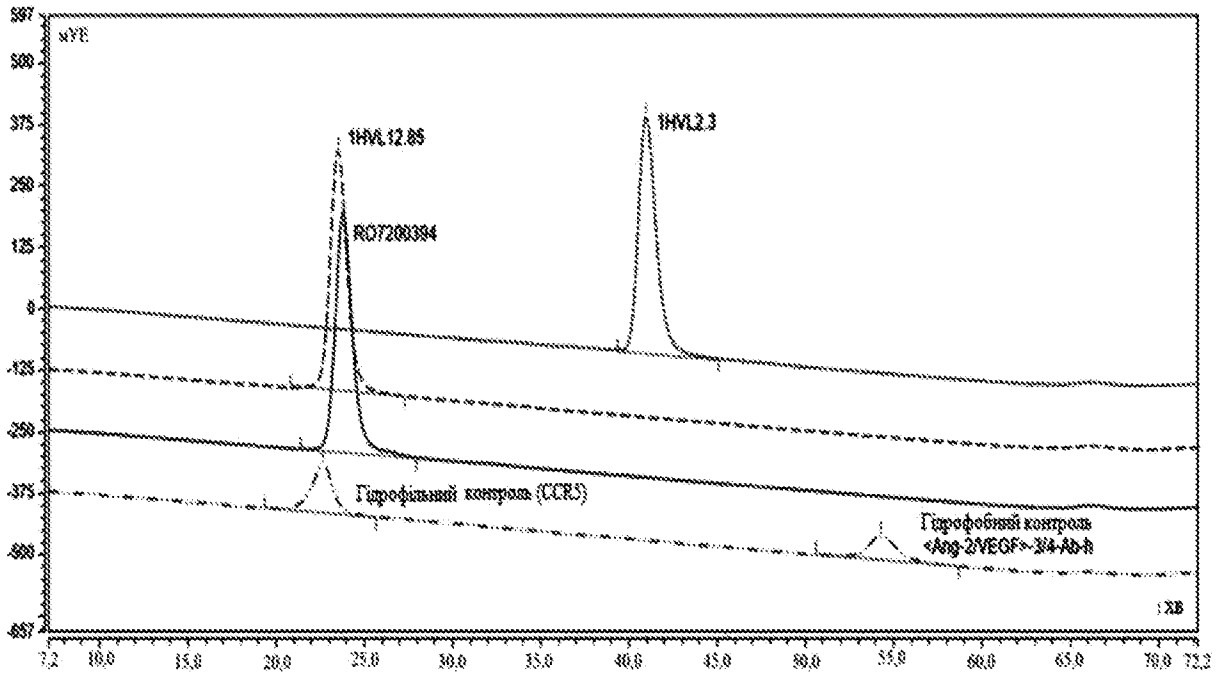
Фиг. 8Б



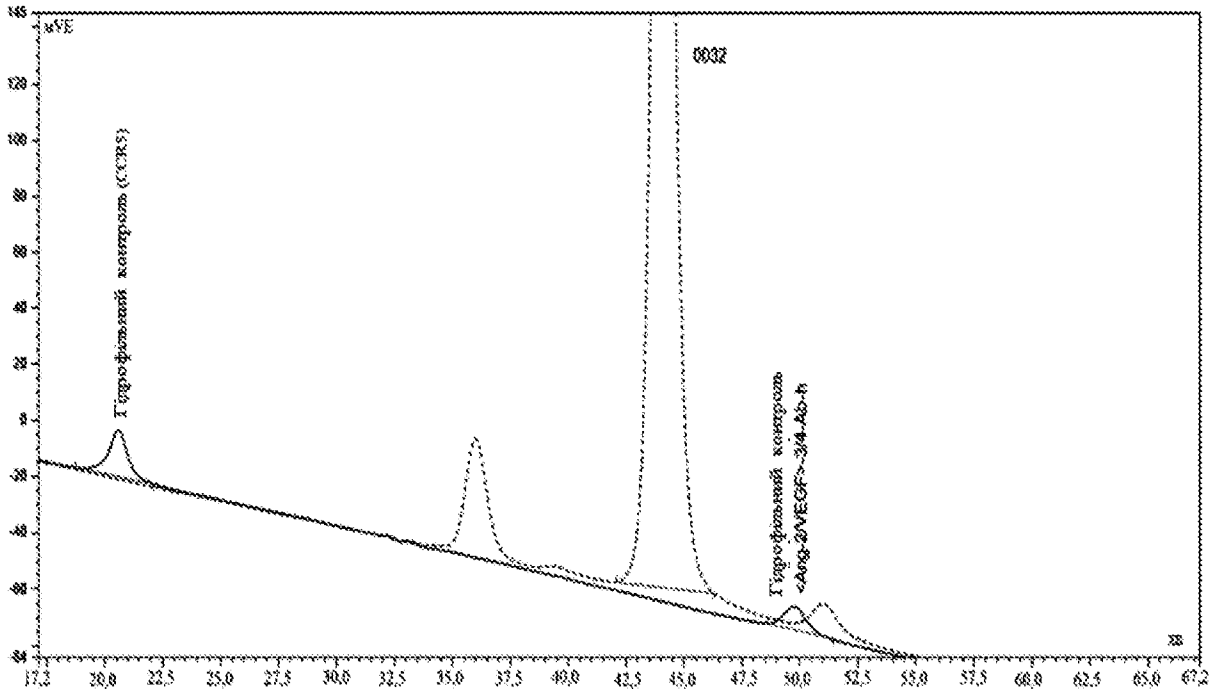
Фиг. 9



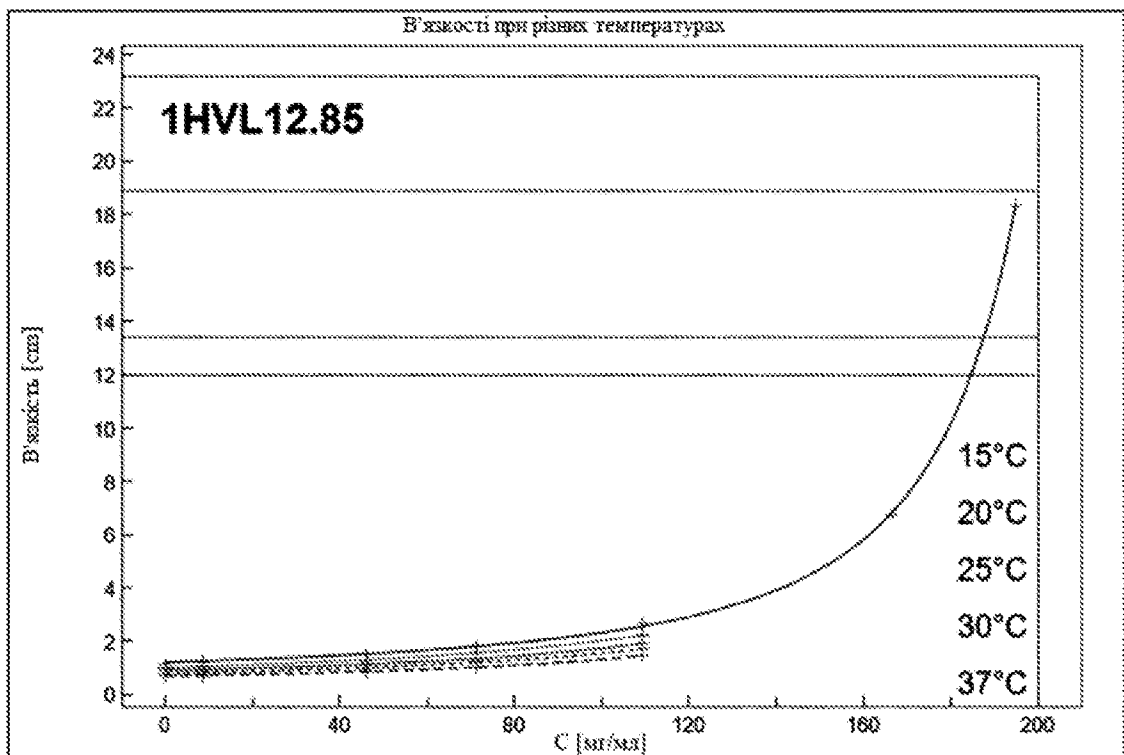
Фиг. 10



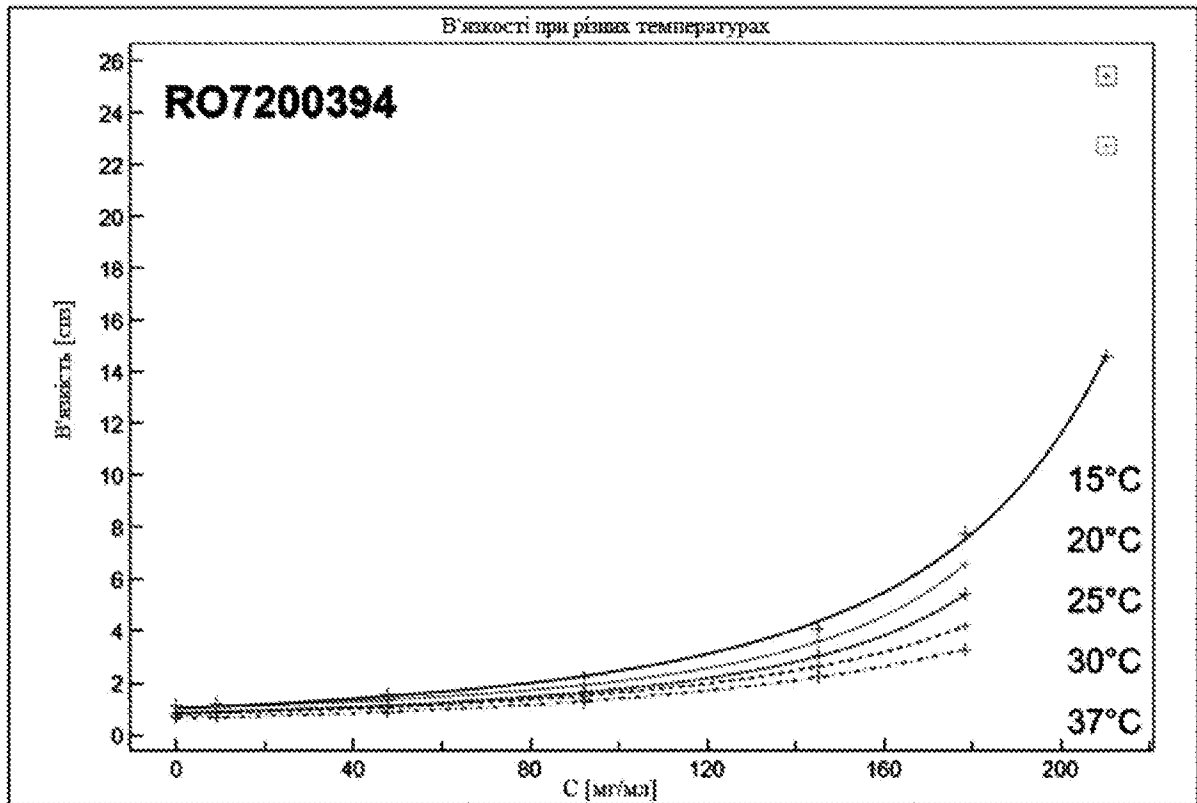
Фиг. 11



Фіг. 12



Фіг. 13



Фіг. 14