



УКРАЇНА

(19) **UA**(11) **125432**(13) **C2**

(51) МПК

C07K 16/22 (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61P 27/02** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2018 00443	(72) Винахідник(и):	Кеніг Патрік (US), Лі Чінгвей Бівіан (US), Раджагопал Картікан (US), Фемілі Амін (US), Фух Жермен (US)
(22) Дата подання заявки:	23.09.2016	(73) Володілець (володільці):	ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080- 4990, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	10.03.2022	(74) Представник:	Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр. №207
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	62/222,698, 62/271,913	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2005/012359 A2, 10.02.2005 WO 2005/044853 A2, 19.05.2005
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	23.09.2015, 28.12.2015		
(33) Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	12.11.2018, Бюл.№ 21		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	09.03.2022, Бюл.№ 10		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2016/053454, 23.09.2016		

(54) ОПТИМІЗОВАНІ ВАРІАНТИ АНТИ-VEGF АНТИТІЛ**(57) Реферат:**

Винахід стосується антитіла, яке специфічно зв'язує фактор росту ендотелію судин (VEGF), причому вказане антитіло містить наступні шість гіперваріабельних ділянок (HVR):

(a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10), а також його застосування для лікування розладів, пов'язаних з патологічним ангиогенезом.

UA 125432 C2

Перелік послідовностей

У поточному додатку міститься перелік послідовностей, який був представлений в електронному вигляді в форматі ASCII і повністю включений в цей опис за допомогою посилання. Зазначена копія ASCII, створена 21 вересня 2016 року, називається 50474-110WO3_Sequence_Listing_9_21_16_ST25 і має розмір 41 764 байт.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Винахід відноситься в цілому до анти-VEGF антитіл, а також до композицій, які включають анти-VEGF антитіла (наприклад, кон'югати антитіл, злиті білки і полімерні склади), з корисними властивостями для дослідницьких, терапевтичних та діагностичних цілей. Винахід також відноситься до способів ідентифікації варіантів антитіл з покращеними властивостями, наприклад, з підвищеною афінністю зв'язування, стабільністю і/або експресією.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Ангіогенез - це строго регульований процес, за допомогою якого нові кровоносні судини формуються з раніше існуючих кровоносних судин. Хоча ангіогенез важливий під час розвитку для забезпечення адекватного кровообігу, велика кількість розладів пов'язана з патологічним ангіогенезом, таким як окулярні розлади (наприклад, вікова дегенерація жовтої плями, AMD) і клітинні проліферативні розлади (наприклад, рак). Фактор росту ендотелію судин (VEGF) є клінічно обґрунтованим драйвером ангіогенезу і нейтралізації VEGF, наприклад, з використанням анти-VEGF блокуючого антитіла, може використовуватися для лікування розладів, пов'язаних з патологічним ангіогенезом.

Залишається потреба в антитілах, таких як анти-VEGF антитіла, з поліпшеною афінністю зв'язування, стабільністю, фармакокінетикою і/або експресією, наприклад, для використання при лікуванні розладів, пов'язаних з патологічним ангіогенезом. Зокрема, існує потреба в композиціях антитіл для доставляння тривалої дії для лікування окулярних розладів (наприклад, AMD (наприклад, вологої AMD), діабетичного макулярного набряку (DME), діабетичної ретинопатії (DR) і оклюзії сітківки (RVO)). Крім того, існує незадоволена потреба в поліпшених способах ідентифікації таких антитіл з покращеними властивостями (наприклад, поліпшеною афінністю зв'язування, стабільністю, фармакокінетикою і/або експресією).

СУТЬ ВИНАХОДУ

В даному винаході запропоновано анти-VEGF антитіла, композиції, які включають анти-VEGF антитіла (наприклад, кон'югати антитіл, злиті білки і полімерні склади) і способи їх застосування, наприклад, для лікування розладів, пов'язаних з патологічним ангіогенезом (наприклад, окулярні розлади і клітинні проліферативні розлади). Винахід також відноситься до способів ідентифікації варіантів антитіл з покращеними властивостями, наприклад, з поліпшеною афінністю зв'язування, стабільністю, фармакокінетикою і/або експресією.

В одному аспекті винахід включає ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язує фактор росту ендотелію судин (VEGF), причому антитіло містить наступні шість гіперваріабельних ділянок (HVR): (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GX₁TPX₂GGX₃ × 4X₅YX₆DSVX₇ × 8 (SEQ ID NO: 2), де X₁ являє собою Ile або His, X₂ являє собою Ala або Arg, X₃ являє собою Tyr або Lys, X₄ являє собою Thr або Glu, X₅ являє собою Arg, Tyr, Gln або Glu, X₆ являє собою Ala або Glu, X₇ являє собою Lys або Glu, а X₈ являє собою Gly або Glu; (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQX₁VSTAVA (SEQ ID NO: 4), де X₁ являє собою Asp або Arg; (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність X₁ASFLYS (SEQ ID NO: 5), де X₁ являє собою Ser або Met; і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність X₁QGYGX₂PFT (SEQ ID NO: 6), де X₁ являє собою Gln, Asn або Thr і X₂ являє собою Ala, Asn, Gln або Arg. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7), GITPAGGYEYADSVKG (SEQ ID NO: 21) або GITPAGGYEYADSVKG (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10) або QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23).

У деяких варіантах здійснення вищевказаного аспекту, антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить

амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло додатково містить наступні каркасні ділянки (FR) варіабельного (VH) домену важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 16). У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло додатково містить наступні FR варіабельного (VL) домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

У деяких варіантах здійснення вищевказаного аспекту, антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23). У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло додатково містить наступні FR ділянки VL домену: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

У деяких варіантах здійснення вищевказаного аспекту, антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло додатково містить наступні FR-ділянки VL домену: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), DIQMTQSPESLSASVGDEVITC (SEQ ID NO: 25) або DIQMTQSPSSLSASVGDEVITC (SEQ ID NO: 26); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18) або WYQQKPGEAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19) або GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло додатково містить наступні FR-ділянки VH домену: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) або EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 51); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 32).

В іншому аспекті винахід відноситься до ізолюваного антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 11, 40 або 42; (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 12, 41 або 46; або (c) домен VH, як в (a), і домен VL, як в (b). У деяких варіантах здійснення винаходу, домен VH додатково містить наступні FR: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14) або WVRQEPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 39); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 16). У деяких варіантах здійснення винаходу, домен VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11. У деяких варіантах

здійснення винаходу, домен VL додатково містить наступні FR: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 17) або DIQMTQSPSSLSASVGDRVITDC (SEQ ID NO: 45); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSATYYC (SEQ ID NO: 44) або GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC (SEQ ID NO: 54); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20) або FGQGTKVEVK (SEQ ID NO: 55). У деяких варіантах здійснення винаходу, домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 33 або 51; (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 12, 34, 35, 36, 37 або 38; або (c) домен VH, як в (a), і домен VL, як в (b). У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло додатково містить наступні FR-ділянки: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) або EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32). У деяких варіантах здійснення винаходу, домен VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33. У деяких варіантах здійснення винаходу, домен VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло додатково містить наступні FR-ділянки: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 17), DIQMTQSPESLSASVGDEVITC (SEQ ID NO: 25) або DIQMTQSPSSLSASVGDEVITC (SEQ ID NO: 26); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18) або WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24) або GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких варіантах здійснення винаходу, домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34. У деяких варіантах здійснення винаходу, домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35. У деяких варіантах здійснення винаходу, домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36. У деяких варіантах здійснення винаходу, домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37. У деяких варіантах здійснення винаходу, домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. У деяких варіантах здійснення винаходу, домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (а) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48 і (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50.

В іншому аспекті винахід відноситься до ізольованого антитіла, яке специфічно зв'язує VEGF, причому антитіло містить (а) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49 і (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, антитіло здатне пригнічувати зв'язування VEGF з рецептором VEGF. У деяких варіантах здійснення винаходу, рецептор VEGF являє собою рецептор 1 VEGF (Flt-1). У деяких варіантах здійснення винаходу, рецептор VEGF являє собою рецептор 2 VEGF (KDR).

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, антитіло зв'язує VEGF людини (hVEGF) з Kd близько 2 нМ або нижче. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло зв'язує hVEGF з Kd між близько 75 пМ і близько 2 нМ. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло зв'язує hVEGF з Kd між близько 75 пМ і близько 600 пМ. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло зв'язує hVEGF з Kd між близько 75 пМ і близько 500 пМ. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло зв'язує hVEGF з Kd близько 80 пМ. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло зв'язує hVEGF з Kd близько 60 пМ.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, антитіло має температуру плавлення (Tm) більш ніж близько 83,5 °C. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло має Tm від близько 85 °C до близько 91 °C. У деяких варіантах здійснення антитіло має Tm близько 89 °C.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло має ізоелектричну точку (pI) нижче ніж 8. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло має pI від близько 5 до близько 7. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло має pI від близько 5 до близько 6.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло є моноклональним, людським, гуманізованим або химерним.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло являє собою фрагмент антитіла, який зв'язує VEGF. У деяких варіантах здійснення винаходу, фрагмент антитіла обрано з групи, що складається з фрагментів Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂. У деяких варіантах здійснення винаходу, фрагмент антитіла являє собою Fab.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло являє собою моноспецифічне антитіло. В інших варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло являє собою мультиспецифічне антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу, мультиспецифічне антитіло являє собою біспецифічне антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу, біспецифічне антитіло зв'язує VEGF і другу біологічну молекулу, обрану з групи, що складається з інтерлейкіну 1β (IL-1β); інтерлейкіну-6 (IL-6); рецептора інтерлейкіну-6 (IL-6R);

інтерлейкіну-13 (IL-13); рецептора IL-13 (IL-13R); PDGF; ангіопоетина; ангіопоетина 2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\text{v}\beta 3$, $\alpha\text{v}\beta 5$ і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліна; апеліна/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNF α ; HTRA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білка, генетично зв'язаного з ризиком вікової макулярної дегенерації (AMD). У деяких варіантах здійснення рецептор VEGF являє собою VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, мембранно-зв'язаний VEGF-рецептор (mbVEGFR) або розчинний рецептор VEGF (sVEGFR). У деяких варіантах здійснення винаходу, білок, генетично пов'язаний з ризиком AMD, обраний з групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора В, фактора Н, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; інтерлейкіну-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; і TNFRSF10A.

В іншому аспекті винахід відноситься до полінуклеотиду (наприклад, ізольованому полінуклеотиду), що кодує будь-яке з описаних в цьому документі антитіл. В іншому аспекті, винахід відноситься до вектору (наприклад, вектору експресії), який містить полінуклеотид для експресії антитіла. В іншому аспекті винахід відноситься до клітин-хазяїв, які містять попередні полінуклеотиди і/або вектори. У деяких варіантах здійснення винаходу, клітина-хазяїн являє собою клітину ссавця. У деяких варіантах здійснення винаходу, клітина ссавця являє собою клітину 293, клітину яєчника китайського хом'ячка (CHO), дріжджову клітину або рослинну клітину. У деяких варіантах здійснення клітина-хазяїн являє собою прокаріотичну клітину. У деяких варіантах здійснення винаходу, прокаріотична клітина являє собою E. coli.

В іншому аспекті винахід відноситься до способу отримання будь-якого з описаних в цьому документі антитіл, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна, яка містить будь-який з попередніх векторів (наприклад, вектори експресії), в культуральному середовищі. У деяких варіантах здійснення винаходу, спосіб додатково включає виділення антитіла з клітини-хазяїна або культурального середовища. У деяких варіантах здійснення винаходу, клітина ссавця являє собою клітину 293, клітину яєчника китайського хом'ячка (CHO), дріжджову клітину або рослинну клітину. У деяких варіантах здійснення винаходу, клітина-хазяїн являє собою прокаріотичну клітину. У деяких варіантах здійснення винаходу, прокаріотична клітина являє собою E. coli.

В іншому аспекті винахід відноситься до способу зменшення або інгібування ангіогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, який включає введення суб'єкту ефективної кількості будь-якого з попередніх антитіл, тим самим зменшуючи або інгібуючи ангіогенез у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення винаходу, розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, являє собою окулярний розлад або клітинний проліферативний розлад. У деяких варіантах здійснення винаходу, розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, являє собою окулярний розлад. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад обирають з групи, яка складається з вікової макулярної дегенерації (AMD), макулярної дегенерації, набряку макули, діабетичного макулярного набряку (DME) (включаючи фокальний, нецентральної DME і дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатії, діабетичної ретинопатії (DR) (включаючи проліферативну DR (PDR), непроліферативну DR (NPDR) і висотну DR), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ретинопатії недоношених (ROP), оклюзії вени сітківки (RVO) (включаючи центральні (CRVO) і розгалужені (BRVO) форми), CNV (включаючи міопічну CNV), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацією сітківки, хвороби, пов'язаної з ретинальною/хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічної короткозорістю, хвороби фон Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу ока, сімейної ексудативної вітреоретинопатії (FEVR), хвороби Коутса, хвороби Норрі, синдрому остеопорозу-псевдогліоми (OPPG), субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярного захворювання очей, неоваскулярної глаукоми, пігментної дистрофії сітківки (RP), гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангіоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, кістозного макулярного набряку (CME), васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (включаючи інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційні (наприклад, алергічний) кон'юнктивіти), вродженого амарозу Лебера, увеїту (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдиту, очного гістоплазмозу, блефариту, сухості очей, травматичного пошкодження очей і хвороби Шегрена. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад являє собою AMD, DME, DR або RVO. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад являє собою AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу, AMD являє собою вологу AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу, розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, є клітинним проліферативним розладом. У деяких варіантах здійснення винаходу, клітинний проліферативний розлад являє собою рак. У деяких варіантах здійснення винаходу, рак обирають з групи, що складається з раку молочної залози, раку товстої кишки, недрібноклітинного раку легені, неходжкінської лімфоми (НХЛ), раку нирки, раку передміхурової

залози, раку печінки, раку голови і шиї, меланоми, раку яєчників, мезотеліоми і множинної мієломи.

В іншому аспекті, винахід відноситься до способу лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом, причому спосіб включає введення ефективної кількості будь-якого з попередніх антитіл суб'єкту, який потребує такого лікування. У деяких варіантах здійснення винаходу, розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою окулярний розлад або клітинний проліферативний розлад. У деяких варіантах здійснення винаходу, розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою окулярний розлад. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад обирають з групи, яка складається з вікової макулярної дегенерації (AMD), макулярної дегенерації, набряку макули, діабетичного макулярного набряку (DME) (включаючи фокальний, нецентральный DME і дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатії, діабетичної ретинопатії (DR) (включаючи проліферативну DR (PDR), непроліферативну DR (NPDR) і висотну DR), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ретинопатії недоношених (ROP), оклюзії вени сітківки (RVO) (включаючи центральні (CRVO) і розгалужені (BRVO) форми), CNV (включаючи міопічну CNV), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацією сітківки, хвороби, пов'язаної з ретинальною/хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічної короткозорістю, хвороби фон Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу ока, сімейної ексудативної вітреоретинопатії (FEVR), хвороби Коутса, хвороби Норрі, синдрому остеопорозу-псевдогліоми (OPPG), субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярного захворювання очей, неоваскулярної глаукоми, пігментної дистрофії сітківки (RP), гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангиоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, кістозного макулярного набряку (CME), васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (включаючи інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційні (наприклад, алергічний) кон'юнктивіти), вродженого амарозу Лебера, увеїту (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдиту, очного гістоплазмозу, блефариту, сухості очей, травматичного пошкодження очей і хвороби Шегрена. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад являє собою AMD, DME, DR або RVO. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад являє собою AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу, AMD являє собою вологу AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу, розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, є клітинним проліферативним розладом. У деяких варіантах здійснення винаходу, клітинний проліферативний розлад являє собою рак. У деяких варіантах здійснення винаходу, рак обирають з групи, що складається з раку молочної залози, раку товстої кишки, недрібноклітинного раку легені, неходжкінської лімфоми (НХЛ), раку нирки, раку передміхурової залози, раку печінки, раку голови і шиї, меланоми, раку яєчників, мезотеліоми і множинної мієломи.

В іншому аспекті винахід відноситься до способу інгібування проникності судин у суб'єкта, що страждає розладом, пов'язаним з небажаною проникністю судин, причому спосіб включає введення суб'єкту ефективної кількості будь-якого з попередніх антитіл, тим самим інгібуючи проникність судин у суб'єкта.

В іншому аспекті винахід відноситься до способу лікування розладу, пов'язаного з небажаною проникністю судин, причому спосіб включає введення ефективної кількості будь-якого з попередніх антитіл суб'єкту, який потребує такого лікування.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів розлад, пов'язаний з небажаною проникністю судин, обирається з групи, що складається з набряку, пов'язаного з пухлинами головного мозку, асцити, асоційованого із злоякісними новоутвореннями, синдрому Мейга, запалення легенів, нефротичного синдрому, перикардіального випоту, плеврального випоту, і проникності, пов'язаної із серцево-судинними захворюваннями.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, спосіб додатково включає введення суб'єкту ефективної кількості другого агента, причому другий агент обраний з групи, що складається з іншого антитіла, хіміотерапевтичного агента, цитотоксичного агента, анти-ангіогенного агента, імунодепресивного агента, проліків, цитокіна, антагоніста цитокінів, цитотоксичної променевої терапії, кортикостероїда, протиблювотного, протиракової вакцини, анальгетика, агента, який інгібує ріст, і сполуки, яка зв'язується з другою біологічною молекулою. У деяких варіантах здійснення винаходу, антиангіогенний агент являє собою антагоніст VEGF. У деяких варіантах здійснення винаходу, антагоніст VEGF являє собою анти-VEGF антитіло, антитіло проти рецептора VEGF, розчинний злитий білок рецептора VEGF, аптамери, анти-VEGF DARPin® або інгібітор тирозинкінази VEGFR. У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF антитіло являє собою ранібізумаб (LUCENTIS®), RTH-258 або біспецифічне анти-VEGF антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу, біспецифічне анти-

VEGF антитіло являє собою анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло являє собою RG-7716. У деяких варіантах здійснення винаходу, розчинний злитий білок рецептора VEGF являє собою афілберцепт (EYLEA®). У деяких варіантах здійснення винаходу, аптамери являє собою пегаптаніб (MACUGEN®). У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF DARPIn® являє собою абіципар пегол. У деяких варіантах здійснення винаходу, інгібітор тирозинкінази VEGFR обирають з групи, що складається з 4-(4-бром-2-фтораніліно) -6-метокси-7-(1-метилпіперидін-4-ілметоксі) хіназоліна (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідін-1-ілпропокси) хіназоліна (AZD2171), ваталаніба (PTK787), семаксамібіна (SU5416) і SUTENT® (сунітиніб). У деяких варіантах здійснення винаходу, друга біологічна молекула обрана з групи, яка складається з IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; ангіопоетина; ангіопоетина 2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліна; апеліна/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNF α ; HtrA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білка, генетично пов'язаного з ризиком AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу, рецептор VEGF являє собою VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR або sVEGFR. У деяких варіантах здійснення винаходу, білок, генетично пов'язаний з ризиком AMD, обраний з групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора B, фактора H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення винаходу, з'єднання, яке зв'язує другу біологічну молекулу, являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах здійснення антигензв'язуючий фрагмент антитіла обрано з групи, яка складається з Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂ фрагментів.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло вводять інтравітреально, окулярно, внутрішньоочно, навколосклерально, субтенонально, суперхороїдально, місцево, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрішньошкірно, крізьшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньоочеревно, внутрішньоочагово, інтракраніально, внутрішньосуглобово, внутрішньопростатично, внутрішньоплеврально, інтратрахеально, інтратекально, інтраназально, інтравагінально, інтраректально, місцево, внутрішньопухлинно, внутрішньоочеревно, перитонеально, інтравентрикулярно, підшкірно, субкон'юктивіно, інтравезикулярно, крізь слизову, інтраперикардіально, внутрішньопуповінно, інтраорбітально, перорально, трансдермально, шляхом інгаляції, шляхом ін'єкції, очними краплями, шляхом імплантації, шляхом інфузії, шляхом безперервної інфузії, локалізованими перфузійними ваннами, які діють на клітини безпосередньо, катетером, промиванням, кремами або ліпідними композиціями. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло вводять інтравітреально, окулярно, інтраокулярно, навколосклерально, субтенонально, суперхороїдально або місцево. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло вводять інтравітреально шляхом ін'єкції. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло вводять місцево за допомогою очних крапель або мазі. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло вводиться пристроєм доставки порт. У деяких варіантах здійснення винаходу, суб'єкт являє собою людину.

В іншому аспекті винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить будь-яке з попередніх антитіл. У деяких варіантах здійснення винаходу, фармацевтична композиція додатково містить полімер. У деяких варіантах здійснення винаходу, полімер являє собою біорозкладаний полімер. У деяких варіантах здійснення винаходу, фармацевтична композиція складена у вигляді депо з полімерного розчинника, полімерного імплантату або полімерної міцели. У деяких варіантах здійснення винаходу, полімер являє собою сополімер полігліколевої кислоти (PLGA) полімолочної кислоти. У деяких варіантах здійснення винаходу, фармацевтична композиція складена у вигляді стрижня PLGA. У деяких варіантах здійснення винаходу, фармацевтична композиція використовується для лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангіогенезом, або розладу, пов'язаного з небажаною проникністю судин у ссавця. У деяких варіантах здійснення винаходу, розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, являє собою окулярний розлад або клітинний проліферативний розлад. У деяких варіантах здійснення винаходу, розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, являє собою окулярний розлад. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад обирають з групи, яка складається з вікової макулярної дегенерації (AMD), макулярної дегенерації, набряку макули, діабетичного макулярного набряку (DME) (включаючи фокальний, нецентральный DME і дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатії, діабетичної ретинопатії (DR) (включаючи проліферативну DR (PDR), непроліферативну DR (NPDR) і висотну DR), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ретинопатії недоношених (ROP), оклюзії вени сітківки (RVO) (включаючи центральні (CRVO) і розгалужені (BRVO) форми), CNV (включаючи міопічну CNV), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацією сітківки, хвороби, пов'язаної з ретинальною/хороїдальною

неоваскуляризацією, патологічної короткозорістю, хвороби фон Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу ока, сімейної ексудативної вітреоретинопатії (FEVR), хвороби Коутса, хвороби Норрі, синдрому остеопорозу-псевдогліоми (OPPG), субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярного захворювання очей, неоваскулярної глаукоми, пігментної дистрофії сітківки (RP), гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангиоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, кістозного макулярного набряку (CME), васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (включаючи інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційні (наприклад, алергічний) кон'юнктивіти), вродженого амарозу Лебера, увеїту (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдиту, очного гістоплазмозу, блефариту, сухості очей, травматичного пошкодження очей і хвороби Шегрена. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад являє собою AMD, DME, DR або RVO. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад являє собою AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу, AMD являє собою вологу AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу, розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, є клітинним проліферативним розладом. У деяких варіантах здійснення винаходу, клітинний проліферативний розлад являє собою рак. У деяких варіантах здійснення винаходу, рак обирають з групи, що складається з раку молочної залози, раку товстої кишки, недрібноклітинного раку легені, неходжкінської лімфоми (НХЛ), раку нирки, раку передміхурової залози, раку печінки, раку голови і шиї, меланоми, раку яєчників, мезотеліоми і множинної мієломи. У деяких варіантах здійснення винаходу, розлад, пов'язаний з небажаною проникністю судин, обирається з групи, що складається з набряку, пов'язаного з пухлинами головного мозку, асцити, асоційованого із злоякісними новоутвореннями, синдрому Мейга, запалення легенів, нефротичного синдрому, перикардіального випоту, плеврального випоту, і проникності, пов'язаної із серцево-судинними захворюваннями. У деяких варіантах здійснення винаходу, фармацевтична композиція додатково містить другий агент, причому другий агент обраний з групи, яка складається з другого антитіла, хіміотерапевтичного агента, цитотоксичного агента, анти-ангіогенного агента, імунодепресивного агента, проліків, цитокіну, антагоніста цитокінів, цитотоксичної променевої терапії, кортикостероїда, протиблювотного, протиракової вакцини, анальгетика, агента, який інгібує ріст, і сполуки, яка зв'язується з другою біологічною молекулою. У деяких варіантах здійснення винаходу, антиангіогенний агент являє собою антагоніст VEGF. У деяких варіантах здійснення винаходу, антагоніст VEGF являє собою анти-VEGF антитіло, антитіло проти рецептора VEGF, розчинний злитий білок рецептора VEGF, аптамери, анти-VEGF DARPin® або інгібітор тирозинкінази VEGFR. У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF антитіло являє собою ранібізумаб (LUCENTIS®), RTH-258 або біспецифічне анти-VEGF антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу, біспецифічне анти-VEGF антитіло являє собою анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло являє собою RG-7716. У деяких варіантах здійснення винаходу, розчинний злитий білок рецептора VEGF являє собою афілберцепт (EYLEA®). У деяких варіантах здійснення винаходу, аптамери являє собою пегаптаніб (MACUGEN®). У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF DARPin® являє собою абіципар пегол. У деяких варіантах здійснення винаходу, інгібітор тирозинкінази VEGFR обирають з групи, що складається з 4-(4-бром-2-фтораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидін-4-ілметоксі) хіназоліна (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідін-1-ілпропокси) хіназоліна (AZD2171), ваталаніба (PTK787), семаксамібіна (SU5416) і SUTENT® (сунітиніб). У деяких варіантах здійснення винаходу, друга біологічна молекула обрана з групи, яка складається з IL-1β; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; ангіопоетина; ангіопоетина 2; Tie2; S1P; інтегринів αvβ3, αvβ5 і α5β1; бетацеллюліна; апеліна/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNFα; HtrA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білка, генетично пов'язаного з ризиком AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу, рецептор VEGF являє собою VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR або sVEGFR. У деяких варіантах здійснення винаходу, білок, генетично пов'язаний з ризиком AMD, обраний з групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора B, фактора H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення винаходу, з'єднання, яке зв'язує другу біологічну молекулу, являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах здійснення антигензв'язуючий фрагмент антитіла обрано з групи, яка складається з Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂ фрагментів.

В іншому аспекті винахід включає кон'югат антитіла, який містить (i) будь-яке з попередніх антитіл і (ii) гідрофільний полімер, ковалентно зв'язаний з антитілом. У деяких варіантах здійснення винаходу, гідрофільний полімер являє собою полімер гіалуронової кислоти (HA) або полімер поліетиленгліколю (ПЕГ). У деяких варіантах здійснення винаходу, гідрофільний

полімер являє собою НА-полімер. У деяких варіантах здійснення винаходу, полімер НА має молекулярну масу близько 1 мільйона дальтон (МДа) або нижче. У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, полімер НА має молекулярну масу між близько 25 кДа і близько 500 кДа. У деяких варіантах здійснення винаходу, полімер НА має молекулярну масу між близько 100 кДа і близько 250 кДа. У деяких варіантах здійснення винаходу, полімер НА має молекулярну масу близько 200 кДа. У деяких варіантах здійснення винаходу, полімер НА не є поперечно зшитим. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло являє собою фрагмент антитіла, який зв'язує VEGF. У деяких варіантах здійснення винаходу, фрагмент антитіла обрано з групи, що складається з фрагментів Fab, Fab-C, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂. У деяких варіантах здійснення винаходу, фрагмент антитіла являє собою Fab, Fab-C або Fab'. У деяких варіантах здійснення винаходу, кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус між близько 10 нм і близько 60 нм. У деяких варіантах здійснення винаходу, кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус між близько 25 нм і близько 35 нм. У деяких варіантах здійснення винаходу, гідродинамічний радіус становить близько 28 нм. У деяких варіантах здійснення винаходу, кон'югат антитіла має окулярний період напіввиведення, який збільшено щодо еталонного антитіла, яке не ковалентно приєднано до гідрофільного полімера. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний період напіввиведення збільшено в щонайменше близько 2 рази відносно еталонного антитіла. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний період напіввиведення збільшено в щонайменше близько 4 рази відносно еталонного антитіла. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний період напіввиведення являє собою вітреальний період напіввиведення. У деяких варіантах здійснення винаходу, еталонне антитіло ідентично антитілу кон'югата антитіла.

В іншому аспекті винахід відноситься до кон'югату антитіл, що містить (i) антитіло, яке специфічно зв'язує VEGF і (ii) полімер НА, ковалентно приєднаний до антитіла, причому полімер НА має молекулярну масу 1 МДа або нижче. У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, полімер НА має молекулярну масу між близько 25 кДа і близько 500 кДа. У деяких варіантах здійснення винаходу, полімер НА має молекулярну масу між близько 100 кДа і близько 250 кДа. У деяких варіантах здійснення винаходу, полімер НА має молекулярну масу близько 200 кДа. У деяких варіантах здійснення винаходу, полімер НА не є поперечно зшитим. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло являє собою фрагмент антитіла, який зв'язує VEGF. У деяких варіантах здійснення винаходу, фрагмент антитіла обрано з групи, що складається з фрагментів Fab, Fab-C, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂. У деяких варіантах здійснення винаходу, фрагмент антитіла являє собою Fab, Fab-C або Fab'. У деяких варіантах здійснення винаходу, кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус між близько 10 нм і близько 60 нм. У деяких варіантах здійснення винаходу, кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус між близько 25 нм і близько 35 нм. У деяких варіантах здійснення винаходу, гідродинамічний радіус становить близько 28 нм. У деяких варіантах здійснення винаходу, кон'югат антитіла має окулярний період напіввиведення, який збільшено щодо еталонного антитіла, яке не ковалентно приєднано до гідрофільного полімера. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний період напіввиведення збільшено в щонайменше близько 2 рази відносно еталонного антитіла. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний період напіввиведення збільшено в щонайменше близько 4 рази відносно еталонного антитіла. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний період напіввиведення являє собою вітреальний період напіввиведення. У деяких варіантах здійснення винаходу, еталонне антитіло ідентично антитілу кон'югата антитіла.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, антитіло ковалентно приєднано до полімеру за допомогою зворотного лінкеру проліків. У деяких варіантах реалізації винаходу, полімер являє собою гідрогель. У деяких варіантах здійснення винаходу, гідрогель являє собою гідрогель на основі ПЕГ. У деяких варіантах здійснення винаходу, гідрогель має форму мікрочастинки сфери.

В іншому аспекті винахід відноситься до злитого білка, який містить будь-яке з попередніх антитіл, ковалентно зв'язаних з НА-зв'язуючим доменом. У деяких варіантах здійснення винаходу, НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до важкого ланцюга або легкого ланцюга антитіла. У деяких варіантах здійснення винаходу, НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до С-кінця важкого ланцюга або С-кінця легкого ланцюга. У деяких варіантах здійснення винаходу, НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до С-кінця легкого ланцюга. У деяких варіантах здійснення винаходу, злитий білок додатково містить лінкер, причому лінкер розташований між антитілом і НА-зв'язуючим доменом. У деяких варіантах здійснення винаходу, лінкер містить амінокислотну послідовність GGGGS (SEQ ID

NO: 61). У деяких варіантах здійснення винаходу, лінкер складається з амінокислотної послідовності GGGGS (SEQ ID NO: 61). У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло являє собою фрагмент антитіла, який зв'язує VEGF. У деяких варіантах здійснення винаходу, фрагмент антитіла обрано з групи, що складається з фрагментів Fab, Fab-C, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂. У деяких варіантах здійснення винаходу, фрагмент антитіла являє собою Fab. У деяких варіантах здійснення винаходу, HA-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до С-кінця домену CH1 Fab. У деяких варіантах здійснення винаходу, HA-зв'язуючий білок ковалентно приєднаний до С-кінця домену CL Fab. У деяких варіантах здійснення винаходу, HA-зв'язуючий домен обрано з групи, яка складається із модуля зв'язку, домену G1 і багатого на лізин олігопептиду. У деяких варіантах здійснення винаходу, HA-зв'язуючий домен є модулем зв'язку. У деяких варіантах здійснення винаходу, модуль зв'язку обирають з групи, що складається з гена 6, стимульованого фактором некрозу пухлини (TSG6), CD44, рецептора гіалуронової кислоти ендотелію лімфатичних судин 1 (LYVE-1), білка, який зв'язує гіалуронову кислоту і протеоглікан (HAPLN) 1, HAPLN2, HAPLN3, HAPLN4, агрекана, бревікана, нейрокана, фосфакана, версікана, CAB61358, KIA0527, стабіліна-1 і стабіліна-2 модулів зв'язку. У деяких варіантах здійснення винаходу, модуль зв'язку є модулем зв'язку TSG6. У деяких варіантах здійснення винаходу, модуль зв'язку TSG6 є модулем зв'язку TSG6 людини або модулем зв'язку TSG6 кролика. У деяких варіантах здійснення винаходу, модуль зв'язку TSG є модулем зв'язку TSG6 людини. У деяких варіантах здійснення винаходу, модуль зв'язку TSG6 людини містить амінокислотні залишки 36-128 TSG6 людини.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, злитий білок додатково містить щонайменше один додатковий HA-зв'язуючий домен. У деяких варіантах здійснення винаходу, щонайменше один додатковий HA-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до важкого ланцюга або легкого ланцюга антитіла. У деяких варіантах здійснення винаходу, щонайменше один додатковий HA-зв'язуючий білок з'єднаний з антитілом за допомогою лінкера. У деяких варіантах здійснення винаходу, лінкер містить амінокислотну послідовність GGGGS (SEQ ID NO: 61). У деяких варіантах здійснення винаходу, лінкер складається з амінокислотної послідовності GGGGS (SEQ ID NO: 61). У деяких варіантах здійснення винаходу, перший HA-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до важкого ланцюга, а другий HA-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до легкого ланцюга. У деяких варіантах здійснення винаходу, перший HA-зв'язуючий домен з'єднаний з С-кінцем важкого ланцюга, а другий HA-зв'язуючий домен з'єднаний з С-кінцем легкого ланцюга. У деяких варіантах здійснення винаходу, щонайменше один додатковий HA-зв'язуючий білок обирають з групи, яка складається з модуля зв'язку, домену G1 і багатого на лізин олігопептида. У деяких варіантах здійснення винаходу, щонайменше один додатковий HA-зв'язуючий білок являє собою модуль зв'язку. У деяких варіантах здійснення винаходу, модуль зв'язку є модулем зв'язку TSG6. У деяких варіантах здійснення винаходу, модуль зв'язку TSG6 є модулем зв'язку TSG6 людини або модулем зв'язку TSG6 кролика. У деяких варіантах здійснення винаходу, модуль зв'язку TSG6 є модулем зв'язку TSG6 людини. У деяких варіантах здійснення винаходу, модуль зв'язку TSG6 людини містить амінокислотні залишки 36-128 TSG6 людини.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, злитий білок специфічно зв'язується з VEGF і HA. У деяких варіантах здійснення винаходу, злитий білок зв'язує HA з Kd близько 2 мкМ або нижче. У деяких варіантах здійснення винаходу, злитий білок зв'язує HA з Kd між близько 1 нМ і близько 500 нМ. У деяких варіантах здійснення винаходу, злитий білок зв'язує HA з Kd між близько 1 нМ і близько 50 нМ. У деяких варіантах здійснення винаходу, злитий білок зв'язує HA з Kd близько 10 нМ.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, злитий білок має окулярний період напіввиведення, який збільшений в порівнянні з еталонним антитілом, яке ковалентно приєднано до HA-зв'язуючого домену. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний період напіввиведення збільшено в щонайменше близько 2 рази відносно еталонного антитіла. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний період напіввиведення збільшено в щонайменше близько 4 рази відносно еталонного антитіла. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний період напіввиведення являє собою вітреальний період напіввиведення. У деяких варіантах здійснення винаходу, еталонне антитіло ідентично антитілу злитого білка.

В іншому аспекті винахід відноситься до способу зменшення або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, який включає введення суб'єкту ефективної кількості будь-якого з попередніх кон'югатів антитіла, тим самим зменшуючи або інгібуючи ангиогенез у суб'єкта.

В іншому аспекті, винахід відноситься до способу лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом, причому спосіб включає введення ефективної кількості будь-якого з попередніх кон'югатів антитіла суб'єкту, який потребує такого лікування.

В іншому аспекті винахід відноситься до способу зменшення або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, який включає введення суб'єкту ефективної кількості будь-якого з попередніх злитих білків, тим самим зменшуючи або інгібуючи ангиогенез у суб'єкта.

В іншому аспекті, винахід відноситься до способу лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом, причому спосіб включає введення ефективної кількості будь-якого з попередніх злитих білків суб'єкту, який потребує такого лікування.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою окулярний розлад. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад обирають з групи, що складається з AMD, макулярної дегенерації, набряку макули, DME (включаючи фокальний, нецентральний DME і дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатії, DR (включаючи PDR, NPDR і висотну DR), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ROP, RVO (включаючи CRVO і BRVO форми), CNV (включаючи міопічну CNV), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризації сітківки, хвороби, пов'язаної з ретинальною/ хориоїдальною неоваскуляризацією, патологічної короткозорості, хвороби фон Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очей, FEVR, хвороби Коутса, хвороби Норрі, OPPG, субкон'юнктивального крововиливу, рубцеозу, неоваскулярного захворювання очей, неоваскулярної глаукоми, RP, гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангиоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, CME, васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (включаючи інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіти), вродженого амарозу Лебера, увеїту (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хориоїдиту, очного гістоплазмозу, блефариту, сухості очей, травматичного пошкодження очей і хвороби Шегрена. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад являє собою AMD, DME, DR або RVO. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад являє собою AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу, AMD являє собою вологу AMD.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, спосіб додатково включає введення суб'єкту ефективної кількості другого агента, причому другий агент обирають з групи, яка складається з іншого антитіла, анти-ангиогенного агента, цитокіна, антагоніста цитокінів, кортикостероїда, анальгетика і сполуки, яка зв'язується з другою біологічною молекулою. У деяких варіантах здійснення винаходу, антиангиогенний агент являє собою антагоніст VEGF. У деяких варіантах здійснення винаходу, антагоніст VEGF являє собою анти-VEGF антитіло, антитіло проти рецептора VEGF, розчинний злитий білок рецептора VEGF, аптамери, анти-VEGF DARPin® або інгібітор тирозинкінази VEGFR. У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF антитіло являє собою ранібізумаб (LUCENTIS®), RTH-258 або біспецифічне анти-VEGF антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу, біспецифічне анти-VEGF антитіло являє собою анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло являє собою RG-7716. У деяких варіантах здійснення винаходу, розчинний злитий білок рецептора VEGF являє собою афілберцепт (EYLEA®). У деяких варіантах здійснення винаходу, аптамери являє собою пегаптаніб (MACUGEN®). У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF DARPin® являє собою абіципар пегол. У деяких варіантах здійснення винаходу, інгібітор тирозинкінази VEGFR обирають з групи, яка складається з 4-(4-бром-2-фтораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидін-4-ілметоксі)хіназоліну (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідін-1-ілпропокси) хіназоліну (AZD2171), ваталаніба (PTK787), семаксамібіна (SU5416) і SUTENT® (сунітиніб). У деяких варіантах здійснення винаходу, друга біологічна молекула обрана з групи, яка складається з IL-1β; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; ангиопоетина; ангиопоетина 2; Tie2; S1P; інтегринів αvβ3, αvβ5 і α5β1; бетацеллюліна; апеліна/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNFα; HtrA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білка, генетично пов'язаного з ризиком AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу, рецептор VEGF являє собою VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR або sVEGFR. У деяких варіантах здійснення винаходу, білок, генетично пов'язаний з ризиком AMD, обраний з групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора B, фактора H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення винаходу, з'єднання, яке зв'язує другу біологічну молекулу, являє собою антитіло або його антигензв'язуючий

фрагмент. У деяких варіантах здійснення антигензв'язуючий фрагмент антитіла обрано з групи, яка складається з Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂ фрагментів.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів кон'югат антитіла вводять інтравітреально, окулярно, внутрішньоочно, навколосклерально, субтенонально, суперхоріодально, місцево, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрішньошкірно, черезшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньоочеревно, внутрішньоочагово, інтракраніально, внутрішньосуглобово, внутрішньопростатично, внутрішньоплеврально, інтратрахеально, інтратекально, інтраназально, інтравагінально, інтраректально, місцево, внутрішньопухлинно, внутрішньоочеревно, перитонеально, інтравентрикулярно, підшкірно, субкон'юктивно, інтравезикулярно, крізь слизову, інтраперикардіально, внутрішньопуповінно, інтраорбітально, перорально, трансдермально, шляхом інгаляції, шляхом ін'єкції, очними краплями, шляхом імплантації, шляхом інфузії, шляхом безперервної інфузії, локалізованими перфузійними ваннами, які діють на клітини безпосередньо, катетером, промиванням, кремами або ліпідними композиціями. У деяких варіантах здійснення винаходу, кон'югат антитіла вводять інтраореально, окулярно, інтраокулярно, навколосклерально, субтенонально, суперхоріодально або місцево. У деяких варіантах здійснення винаходу, кон'югат антитіла вводять інтравітреально шляхом ін'єкції. У деяких варіантах здійснення винаходу, кон'югат антитіла вводять місцево за допомогою очних крапель або мазі. У деяких варіантах здійснення винаходу, кон'югат антитіла вводиться пристроєм доставки порт.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів злитий білок вводять інтравітреально, окулярно, внутрішньоочно, навколосклерально, субтенонально, суперхоріодально, місцево, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрішньошкірно, черезшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньоочеревно, внутрішньоочагово, інтракраніально, внутрішньосуглобово, внутрішньопростатично, внутрішньоплеврально, інтратрахеально, інтратекально, інтраназально, інтравагінально, інтраректально, місцево, внутрішньопухлинно, внутрішньоочеревно, перитонеально, інтравентрикулярно, підшкірно, субкон'юктивно, інтравезикулярно, крізь слизову, інтраперикардіально, внутрішньопуповінно, інтраорбітально, перорально, трансдермально, шляхом інгаляції, шляхом ін'єкції, очними краплями, шляхом імплантації, шляхом інфузії, шляхом безперервної інфузії, локалізованими перфузійними ваннами, які діють на клітини безпосередньо, катетером, промиванням, кремами або ліпідними композиціями. У деяких варіантах здійснення винаходу, злитий білок вводять інтравітреально, окулярно, інтраокулярно, навколосклерально, субтенонально, суперхоріодально або місцево. У деяких варіантах здійснення винаходу, злитий білок вводять інтравітреально шляхом ін'єкції. У деяких варіантах здійснення винаходу, злитий білок вводять місцево за допомогою очних крапель або мазі. У деяких варіантах здійснення винаходу, злитий білок вводиться пристроєм доставки порт. У деяких варіантах здійснення винаходу, суб'єкт являє собою людину.

В іншому аспекті винахід відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить будь-який з попередніх кон'югатів антитіла.

В іншому аспекті винахід відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить будь-який з попередніх злитих білків.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, фармацевтична композиція використовується для лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом у ссавця. У деяких варіантах здійснення винаходу, розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою окулярний розлад. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад обирають з групи, що складається з AMD, макулярної дегенерації, набряку макули, DME (включаючи фокальний, нецентральний DME і дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатії, DR (включаючи PDR, NPDR і висотну DR), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ROP, RVO (включаючи CRVO і BRVO форми), CNV (включаючи міопічну CNV), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризації сітківки, хвороби, пов'язаної з ретинальною/ хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічної короткозорості, хвороби фон Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очей, FEVR, хвороби Коутса, хвороби Норрі, OPPG, субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярного захворювання очей, неоваскулярної глаукоми, RP, гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангиоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, CME, васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (включаючи інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт), вродженого амарозу Лебера, увеїту (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдиту, очного гістоплазмозу, блефариту, сухості очей, травматичного пошкодження очей і хвороби Шегрена. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад являє

собою AMD, DME, DR або RVO. У деяких варіантах здійснення винаходу, окулярний розлад являє собою AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу, AMD являє собою вологу AMD.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів фармацевтична композиція додатково містить другий агент, причому другий агент обирають з групи, яка складається з іншого антитіла, анти-ангіогенного агента, цитокіна, антагоніста цитокінів, кортикостероїда, анальгетика і сполуки, яка зв'язується з другою біологічною молекулою. У деяких варіантах здійснення винаходу, антиангіогенний агент являє собою антагоніст VEGF. У деяких варіантах здійснення винаходу, антагоніст VEGF являє собою анти-VEGF антитіло, антитіло проти рецептора VEGF, розчинний злитий білок рецептора VEGF, аптамери, анти-VEGF DARPIn® або інгібітор тирозинкінази VEGFR. У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF антитіло являє собою ранібізумаб (LUCENTIS®), RTH-258 або біспецифічне анти-VEGF антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу, біспецифічне анти-VEGF антитіло являє собою анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло являє собою RG-7716. У деяких варіантах здійснення винаходу, розчинний злитий білок рецептора VEGF являє собою афілберцепт (EYLEA®). У деяких варіантах здійснення винаходу, аптамери являє собою пегаптаніб (MACUGEN®). У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF DARPIn® являє собою абіципар пегол. У деяких варіантах здійснення винаходу, інгібітор тирозинкінази VEGFR обирають з групи, що складається з 4-(4-бром-2-фтораніліно) -6-метокси-7-(1-метілпіперидін-4-ілметоксі) хіназоліна (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідін-1-ілпропокси) хіназоліна (AZD2171), ваталаніба (PTK787), семаксамібіна (SU5416) і SUTENT® (сунітиніб). У деяких варіантах здійснення винаходу, друга біологічна молекула обрана з групи, яка складається з IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; ангіопоетина; ангіопоетина 2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліна; апеліна/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNF α ; HtrA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білка, генетично пов'язаного з ризиком AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу, рецептор VEGF являє собою VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR або sVEGFR. У деяких варіантах здійснення винаходу, білок, генетично пов'язаний з ризиком AMD, обраний з групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора B, фактора H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення винаходу, з'єднання, яке зв'язує другу біологічну молекулу, являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах здійснення антигензв'язуючий фрагмент антитіла обрано з групи, яка складається з Fab, Fab'-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂ фрагментів.

В іншому аспекті винахід відноситься до способу ідентифікації зміни амінокислотного залишку, який забезпечує посилення зв'язування антитіла з молекулою-мішенню, причому спосіб включає: (а) забезпечення бібліотеки дисплея, яка містить нуклеїнові кислоти, що кодують варіанти антитіла-кандидата, причому кожен варіант антитіла-кандидата містить зміну амінокислотного залишку в VH або VL в порівнянні з еталонним антитілом, і в якому зміні амінокислотного залишку в кожному положенні VH або VL присутні в бібліотеці дисплея; (b) сортування бібліотеки дисплея на основі зв'язування варіантів антитіла-кандидата з молекулою-мішенню з утворенням сортованої бібліотеки, причому сортована бібліотека містить варіанти антитіла-кандидата з поліпшеним зв'язуванням з молекулою-мішенню в порівнянні з еталонним антитілом; і (с) порівняння частоти, з якою кожна зміна амінокислотного залишку присутня в бібліотеці дисплея і в сортованій бібліотеці, як визначено за допомогою масового паралельного сіквенування, тим самим визначаючи, чи буде кожна зміна амінокислотного залишку збагачена в сортованій бібліотеці в порівнянні з бібліотекою дисплея в якій зміна амінокислотного залишку ідентифікується як та, що сприяє посиленому зв'язуванню з молекулою-мішенню, якщо вона збагачена в сортованій бібліотеці в порівнянні з бібліотекою дисплея.

В іншому аспекті винахід відноситься до способу ідентифікації зміни амінокислотного залишку, який забезпечує підвищену стабільність антитіла, причому спосіб включає: (а) забезпечення бібліотеки дисплея, яка містить нуклеїнові кислоти, що кодують варіанти антитіла-кандидата, причому кожен варіант антитіла-кандидата містить зміну амінокислотного залишку в VH або VL в порівнянні з еталонним антитілом, і в якому зміні амінокислотного залишку в кожному положенні VH або VL присутні в бібліотеці дисплея; (b) сортування бібліотеки дисплея на основі зв'язування варіантів антитіла-кандидата з молекулою-мішенню з утворенням сортованої бібліотеки, причому сортована бібліотека містить варіанти антитіла-кандидата з поліпшеною стабільністю в порівнянні з еталонним антитілом; і (с) порівняння частоти, з якою кожна зміна амінокислотного залишку присутня в бібліотеці дисплея і в сортованій бібліотеці, як визначено за допомогою масового паралельного сіквенування, тим самим визначаючи, чи буде кожна зміна амінокислотного залишку збагачена в сортованій бібліотеці в порівнянні з бібліотекою

дисплея в якій зміна амінокислотного залишку ідентифікується як та, що додає підвищену стабільність антитілу, якщо вона збагачена в сортованій бібліотеці в порівнянні з бібліотекою дисплея.

5 У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, спосіб додатково включає в себе визначення частоти, з якою кожна зміна амінокислот присутня в бібліотеці дисплея і сортованій бібліотеці шляхом масового паралельного сіквенування на наступному етапі (b).

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, зміна амінокислотного залишку збагачена щонайменше в 2 рази в сортованій бібліотеці в порівнянні з бібліотекою дисплея.

10 У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів бібліотека дисплея обирається з групи, яка складається з бібліотеки фагового дисплея, бібліотеки дисплея бактерій, бібліотеки дисплея дріжджів, бібліотеки дисплея ссавців, бібліотеки дисплея рибосом і бібліотеки дисплея мРНК. У деяких варіантах здійснення винаходу, бібліотека дисплея являє собою бібліотеку фагового дисплея.

15 У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, зміна амінокислотного залишку кодується набором вироджених кодонів. У деяких варіантах здійснення винаходу, набір вироджених кодонів являє собою набір NNK або NNS кодону, де N являє собою A, C, G або T; K являє собою G або T; і S являє собою C або G. У деяких варіантах здійснення винаходу, набір вироджених кодонів являє собою набір кодонів NNK.

20 У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, сортування етапу (b) включає контакт бібліотеки дисплея з іммобілізованою молекулою-мішенню або епітопом.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, сортування етапу (b) включає контакт бібліотеки дисплея з розчинною молекулою-мішенню або епітопом.

25 У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, бібліотека дисплея містить щонайменше 1×10^6 варіантів антитіла-кандидата. У деяких варіантах здійснення винаходу, бібліотека дисплея містить щонайменше 1×10^8 варіантів антитіл. У деяких варіантах здійснення винаходу, бібліотека дисплея містить щонайменше 1×10^9 варіантів антитіл.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, масове паралельне сіквенування включає в себе глибоке сіквенування, ультра-глибоке сіквенування і/або сіквенування наступного покоління.

30 У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло являє собою моноклональне антитіло.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло являє собою антитіло IgG.

35 У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло являє собою фрагмент антитіла. У деяких варіантах здійснення винаходу, фрагмент антитіла обирають з групи, яка складається з Fab, scFv, Fv, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ і діатіла. У деяких варіантах здійснення винаходу, фрагмент антитіла являє собою Fab.

40 У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів, спосіб додатково включає в себе генерацію антитіла, яке містить зміну амінокислотного залишку, ідентифіковану стадіями способу.

У деяких аспектах будь-яке з попередніх антитіл може бути використано при виготовленні лікарського засобу для зменшення або інгібування ангіогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом.

45 У деяких аспектах будь-яке з попередніх антитіл може бути використано при виготовленні лікарського засобу для лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангіогенезом у суб'єкта, що потребує такого лікування.

У деяких аспектах будь-яке з попередніх антитіл може бути використано при виготовленні лікарського засобу для інгібування проникності судин у суб'єкта, що страждає розладом, пов'язаним з небажаною проникністю судин.

50 У деяких аспектах будь-яке з попередніх антитіл може бути використано в способі зниження або інгібування ангіогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом.

У деяких аспектах будь-яке з попередніх антитіл може бути використано в способі лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангіогенезом у суб'єкта, що потребує такого лікування.

55 У деяких аспектах будь-яке з попередніх антитіл може бути використано в способі інгібування проникності судин у суб'єкта, що страждає розладом, пов'язаним з небажаною проникністю судин.

В іншому аспекті винахід відноситься до композиції, що містить будь-яке з попередніх антитіл для використання в способі зменшення або інгібування ангіогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом.

В іншому аспекті винахід відноситься до композиції, що містить будь-який з попередніх антитіл для використання в способі лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом у суб'єкта, що потребує такого лікування.

В іншому аспекті винахід відноситься до композиції, що містить будь-який з попередніх антитіл для використання в способі інгібування проникності судин у суб'єкта, що страждає розладом, пов'язаним з небажаною проникністю судин.

У деяких аспектах будь-який з попередніх кон'югатів антитіл може бути використаний при виготовленні лікарського засобу для зменшення або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом.

У деяких аспектах будь-який з попередніх кон'югатів антитіла може бути використаний при виготовленні лікарського засобу для лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом у суб'єкта, що потребує такого лікування.

У деяких аспектах будь-який з попередніх кон'югатів антитіла може бути використаний в способі зниження або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом.

У деяких аспектах будь-який з попередніх кон'югатів антитіла може бути використаний в способі лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом у суб'єкта, що потребує такого лікування.

В іншому аспекті винахід відноситься до композиції, що містить будь-який з попередніх кон'югатів антитіла для використання в способі зменшення або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом.

В іншому аспекті винахід відноситься до композиції, що містить будь-який з попередніх кон'югатів антитіла для використання в способі лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом у суб'єкта, що потребує такого лікування.

У деяких аспектах будь-який з попередніх злитих білків може бути використаний при виготовленні лікарського засобу для зменшення або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом.

У деяких аспектах будь-який з попередніх злитих білків може бути використаний при виготовленні лікарського засобу для лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом у суб'єкта, що потребує такого лікування.

У деяких аспектах будь-який з попередніх злитих білків може бути використаний в способі зниження або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом.

У деяких аспектах будь-який з попередніх злитих білків може бути використаний в способі лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом у суб'єкта, що потребує такого лікування.

В іншому аспекті винахід відноситься до композиції, що містить будь-який з попередніх злитих білків для використання в способі зменшення або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом.

В іншому аспекті винахід відноситься до композиції, що містить будь-який з попередніх злитих білків для використання в способі лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом у суб'єкта, що потребує такого лікування.

Слід розуміти, що будь-який з варіантів здійснення винаходу, описаних вище, щодо способів лікування (наприклад, щодо властивостей антитіл, додаткових терапевтичних агентів, розладів, пов'язаних з патологічним ангиогенезом (наприклад, окулярних розладів, таких як AMD, DME, DR або RVO), шляхів введення (наприклад, інтравітреальної ін'єкції) тощо) можуть бути використані в контексті лікарських засобів, застосувань і композицій, описаних вище.

Короткий опис графічних матеріалів

ФІГ. 1A-1F являють собою теплові мапи, що показують $\log_2$ коефіцієнта збагачення (також який називають $\log_2$ коефіцієнта збагачення) для всіх мутацій в пеннігах, отриманих з проходження NNK VH (фіг. 1A-1C) і VL (фіг. 1D-1F) бібліотек проти анти-gD мітки антитіла (анти-gD), білка L або білка A. Послідовність амінокислот G6.31 дикого типу VH (фіг. 1A-1C) або VL (фіг. 1D-1F), починаючи з положення 2, показана нижче кожної теплової мапи. На фіг. 1A показані результати, отримані при пеннінгу проходження NNK бібліотеки VH проти анти-gD. На фіг. 1B показані результати, отримані при пеннінгу проходження NNK VH бібліотеки проти білка L. На фіг. 1C показані результати, отримані при пеннінгу проходження NNK бібліотеки VH проти білка A. На фіг. 1D показані результати, отримані при пеннінгу проходження NNK бібліотеки VL проти анти-gD. На фіг. 1E показані результати, отримані при пеннінгу проходження NNK бібліотеки VL проти білка L. На фіг. 1F показані результати, отримані при пеннінгу проходження NNK бібліотеки VL проти білка A.

ФІГ. 2A-2B представляють собою серію графіків і таблиць, що показують кореляцію між $\log_2$ коефіцієнтів збагачення від пеннінга VH (фіг. 2A) і VL (фіг. 2B) проти анти-gD-мітки антитіла ("gD"), білка A ("білок A") і білка L ("білок L"). В таблицях показано коефіцієнт кореляції Пірсона (r^2 ; "Кор") для порівняння між (i) gD і білком A; (ii) gD і білком L; і (iii) білком A і білком L.

5 Кореляція для коефіцієнтів збагачення мутацій в позиціях, класифікованих як ті, що належать до гідрофобного ядра ("ядро"), розширеного гідрофобного ядра ("розширене ядро"), поверхні VH/VL ("поверхня") або положенням, які утворюють важливі водневі зв'язки, сольові мости або іншим чином представляють інтерес ("інше"). Ці цифри показують, що використання анти-gD антитіла, білка A або білка L для виявлення згортання Fab-молекули у фага дає аналогічні

10 результати. Єдиними мутаціями, які значно відрізнялися за своїми коефіцієнтами збагачення в різних пеннінгах, є ті, які розташовані безпосередньо в сайтах зв'язування білка A або білка L. Ці залишки маркуються як "білок A", "білок L 1" і "білок L 2" (існують два сайти зв'язування для білка L), відповідно. Сайти зв'язування для білка L описані в Graille et al. Structure 9 (8): 679-687, 2001, що включена в цей опис за допомогою посилання у всій її повноті. Зв'язуючі сайти для білка G описані в Graille et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(10): 5399-5404, 2000, що включена в

15 цей опис за допомогою посилання у всій її повноті.

ФІГ. 3A-3B - графіки, що показують $\log_2$ коефіцієнта збагачення для всіх мутацій в заданому положенні в VH (фіг. 3A) і VL (фіг. 3B). Позиції затінені в залежності від того, чи знаходяться вони в гідрофобному ядрі (темно-сірий), в розширеному гідрофобному ядрі (сірий) або в інтерфейсі VH/VL (світло-сірий). Позиції, які зберігаються і не переносять мутації ($\log_2$ коефіцієнта збагачення Z-бали $< -0,5$), позначені.

ФІГ. 3C-3D являють собою візуалізацію кристалічної структури антиген-вільного G6 Fab (код банку даних білка (PDB): 2FJF), що показує місце розташування збережених позицій в структурі VH (фіг. 3C) і VL (фіг. 3D), відповідно. Схема затінення така ж, як на фіг. 3A-3B. Крім того,

25 вказуються збережені позиції, які утворюють важливі водневі зв'язки, сольові містки або мають важливе значення.

ФІГ. 4A-4B являють собою теплові мапи, що показують $\log_2$ коефіцієнта збагачення всіх окремих амінокислотних заміщень, отриманих шляхом пеннінга проходження NHK бібліотеки VH (фіг. 4A) і VL (фіг. 4B) проти VEGF.

ФІГ. 5A-5B являють собою графіки, що показують, що $\log_2$ коефіцієнтів збагачення, отримані шляхом пеннінга VEGF бібліотек VH (фіг. 5A) і VL (фіг. 5B), мають бімодальний розподіл. Мутації, які були виснажені за межею виявлення, були встановлені на максимальне виснаження, яке спостерігається, для конкретного експерименту. Мутації пофарбовані відповідно до їх розташування в HVR, в консервативній рамці, як визначено за допомогою

30 пеннінга gD, або іншої частини рамки.

ФІГ. 5C-5D являють собою графіки, що показують порівняння між $\log_2$ коефіцієнта збагачення від пеннінга VEGF обраних мутацій зі зміною Kd відносно до батьківського антитіла G6.31 (фіг. 5C) або зміни температури плавлення (T_m) відносно до G6.31 (фіг. 5D). Використана та ж схема затінення, що і на фіг. 5A-5B.

ФІГ. 5E-5F являють собою візуалізацію кристалічної структури VEGF-зв'язаної форми VH (фіг. 5E) і VL (фіг. 5F) G6 Fab (код PDB 2FJG), що показує розташування обраних мутацій у вигляді сфер. Поверхня VEGF показана як представлення поверхні. Використана та ж схема затінення, що і на фіг. 5A-5B. На етикетці показана зміна в T_m ($^{\circ}\text{C}$) і кратна зміна в афінності зв'язування (Kd) в порівнянні з G6.31.

ФІГ. 6A являє собою накладені візуалізації молекул, присутніх в кристалічній структурі антиген-вільного G6 Fab (PDB 2FJF), що показують різні кути вигину Fab, демонстровані молекулами.

ФІГ. 6B-6C являє собою візуалізацію, яка демонструє детальний вид поверхні VL-VH і конформації бічного ланцюга LC-83F і LC-106I в молекулах з невеликим кутом вигину Fab (фіг. 6B, темно-сірий) і з молекулами з великим кутом вигину Fab (фіг. 6C, світло-сірий), відповідно.

50 Для ясності видалені β -нить E, спіраль α -1 і петля, що з'єднує обидва елементи.

ФІГ. 7A являє собою графік (права вставка), що показує кут χ_1 (χ_1) положення LC-F83 з 319 структур антитіл людини з PDB. Візуалізація (ліва вставка) показує положення LC-F83 в конформаціях "в" і "назовні".

ФІГ. 7B являє собою графік (права вставка), що показує кут вигину остову конформації для ψ (ψ) кута в положенні 105 і ϕ (ϕ) кута в положенні 106. Структури затінені відповідно до їх кута χ_1 , як показано на фіг. 7A. Візуалізація (ліва вставка) показує положення 103-108 легкого ланцюга (LC) в конформаціях "в" і "назовні".

ФІГ. 7C являє собою серію графіків, що показують кут вигину (справа вгорі) і площа контакту VL/CL (внизу праворуч) для структур антитіл з LC-F83 в "в"-конформації і "назовні"-конформації.

60 Результати порівнюються з кутом вигину Fab і розміром поверхні VL/CL 319 людських Fab-

структур з PDB, які несуть LC-F83 і 22 людських структур, які несуть LC-83A. На лівій вставці показані накладені візуалізації молекули G6, що мають великий кут вигину і невеликий кут вигину. Площа контакту VL/CL позначається колом.

5 ФІГ. 8A являє собою графік, що показує кут χ_1 для LC-F83 для кристалічної структури G6 Fab з великим кутом вигину (ланцюга G6 VU, G6-VU) і кристалічної структури з малим кутом вигину (ланцюга G6 BA, G6-BA).

ФІГ. 8B являє собою графік, який показує результати імітації молекулярної динаміки для зазначених молекул. Кут вигину будується як функція часу.

10 ФІГ. 8C являє собою графік, який показує результати імітації молекулярної динаміки, яка зображує кут вигину Fab як функції від кута крутіння VH/VL ("HL-кут"). Графік розсіювання/контурний графік показує кут крутіння VH/VL і кут вигину, який VU.F83 (темно-сірий) і VU.F83A (світло-сірий) приймають під час імітації молекулярної динаміки. Дві різні популяції видно для двох молекул.

15 ФІГ. 9A являє собою графік, що показує розподіл кута вигину Fab для молекул BA-F83 (LC-F83 в "назовні"-конформації), BA-F83A, VU-F93 (LC-F83 в "в"-конформації) і VU-F83A, отриманий за останні 75 нс із 100 нс імітації молекулярної динаміки. Всі зразки значно відрізнялися ($p < 0,001$), за винятком BA-F83 і BA-F83A, як визначено аналізом дисперсії (ANOVA)/прямим тестом Т'юки достовірної відмінності (HSD).

20 ФІГ. 9B являє собою графік, що показує крутіння VH/VL для п'яти молекул G6_{не пов'язаний} з LC-F83 в "назовні" конформації (чорний) і п'яти молекул з G6_{не пов'язаний} з LC-F83 в "в" конформації (темно-сірий) як кут крутіння VH/VL VEGF-зв'язаних G6 структур ("AG зв'язок", світло-сірий).

25 ФІГ. 9C являє собою графік, який показує розподіл кутів крутіння VH/VL тих же молекул, що і на фіг. 9A, під час тієї ж 100 нс імітації молекулярної динаміки. Всі зразки істотно відрізнялися ($p < 0,001$), за винятком BA-F83A і VU-F83A, як визначено дисперсійним аналізом ANOVA/тестом Т'юки HSD.

30 ФІГ. 9D являє собою візуалізацію кристалічної структури незв'язаного G6, показує області, які мають різні схеми обміну водень-дейтерію між G6.31 і G6.31_{LC-F83A}. Ділянки, пофарбовані темно-сірим, мали більш повільний обмін в G6.31_{LC-F83A} в порівнянні з G6.31, тоді як ділянки, пофарбовані сірим, мали більш швидкий обмін в G6.31_{LC-F83A} в порівнянні з G6.31. Позиції мутації F83A і петлі DE позначені лініями.

35 ФІГ. 10A являє собою графік, що показує розподіл соматичних мутацій для зазначених положень VL послідовностей антитіл, що походять з зародкових ліній IGKV1. Мутаційний розподіл на верхній вставці було отримано з використанням загальнодоступних послідовностей людських антитіл з Genbank, бази даних протеїнів (PDB), бази даних Кабат, бази даних Абсис і бази даних IMGT ("Public dataset"). Мутаційний розподіл на нижній вставці було отримано з використанням секвенування однієї молекули кДНК в реальному часі (SMRT), отриманої з більш ніж 1000 окремих лімфоїдних тканин людини. Високі швидкості мутацій на N-кінці загальнодоступних послідовностей, ймовірно, відбуваються через клонування артефактів.

40 ФІГ. 10B являє собою графік, що показує найбільш поширені мутації в положенні LC-83 для послідовностей IGKV1.39 із Загального набору даних, описаного на фіг. 10A і Прикладі 8 (Sanger) або набору даних SMRT (PacBio). IGKV1.39 несе фенілаланін в положенні LC-83. Точки фарбуються відповідно до розміру амінокислоти. Великі амінокислоти пофарбовані в жовтий колір, а маленькі амінокислоти пофарбовані в темно-червоний колір.

45 ФІГ. 10C являє собою графік, що показує найбільш поширені мутації в позиції LC-106 для всіх послідовностей IGKJ, виявлених в Загальному наборі даних (Sanger) або в наборі даних SMRT (PacBio). Точки затінені відповідно до розміру амінокислоти. Великі амінокислоти пофарбовані в світло-сірий колір, а маленькі амінокислоти пофарбовані в темно-сірий колір.

50 ФІГ. 10D являє собою серію графіків, що показують спорідненість (K_d) обраних варіантів мутантів G6.31, як виміряно за допомогою поверхневого плазмонного резонансу BIACORE® (ліва вставка) і температури плавлення T_m для обраних варіантів мутантів G6.31, як визначено диференціальною скануючою флуориметрією (DSF) (права вставка). Кола на лівій вставці представляють середнє з трьох повторів з відповідним стандартним відхиленням, показаним смужками помилок. Кола на правій вставці представляють середнє з трьох повторів і відповідне стандартне відхилення, показане смужками помилок.

55 ФІГ. 11A являє собою графік, що показує фармакокінетику рідини і склоподібного тіла для кожного з G6.31 AAEE, G6.31 ДТ і G6.31 AARR після інтравітреального введення (IVT) відповідного Fab в очі кролика, як описано в прикладі 11.

60 ФІГ. 11B являє собою графік, що показує коефіцієнт розпаду в сироватці кожного з G6.31 AAEE, G6.31 ДТ і G6.31 AARR після інтравітреального введення відповідного Fab в очі кролика, як описано в прикладі 11.

ФІГ. 12 являє собою таблицю, яка показує аналіз фрагментації капілярним електрофорезом - додецилсульфатом натрію (CE-SDS) для зазначених клонів антитіл. Фрагментація являє собою відсоток низькомолекулярних об'єктів (% HMB) через 4 тижні, 12 тижнів і 24 тижні при 37 °C в PBS. Фрагментація послідовно знижується в усіх варіантах N94A в порівнянні з G6.31 дикого типу. Об'єкти з високою молекулярною масою (% BMB) вказують на домішки або агрегати. Основний розмір піку в цьому аналізі безпосередньо не корелює зі ступенем фрагментації, але залежить від розміру і об'єму фрагмента барвника. Анти-VEGF Fab ранібізумаба слугував в якості контролю.

ФІГ. 13 являє собою графік, що показує графік інгібування міграції HUVEC, індукованої VEGF, варіантом G6.31 LC-N94A в порівнянні з вихідним G6.31 при різних концентраціях Fab, як описано в прикладі 12.

ФІГ. 14 являє собою графік, що показує гель-фільтраційну хроматографію (SEC) і аналіз багатокутного розсіювання світла з коефіцієнтом заломлення (RI) (MALS) (SEC-RI-MALS) для HA40K-rabFab, HA200K-rabFab і HA600K-rabFab з перекриттям середньомасової молярної маси (Mw).

ФІГ. 15 являє собою графік, що показує, що гіалуронова кислота (HA), яка кон'югована із rabFab, зберігає ферментативну сприйнятливість до перетравлювання гіалуронідазами-2 (HYAL2), як оцінюється аналізом SEC-MALS з HYAL2-інкубованою HA і HA100K-rabFab. Для зразків HA-rabFab права вісь Mw виражається як Mw компонента HA тільки кон'югату.

ФІГ. 16 являє собою графік, що показує виведення ранібізумаба, rabFab і HA100K-rabFab ("лінійний HA-rabFab") з склоподібного тіла кролика після інтравітреальної ін'єкції. HA100K-rabFab показав період напіввиведення приблизно 11,9 днів, у порівнянні з приблизно 2,5 днями для rabFab.

ФІГ. 17 являє собою графік, що показує, що час вітреального перебування лінійно корелює з гідродинамічним радіусом (Rh, який позначено як "R_n" на графіку) в склоподібному тілі кролика. Для передбачення періодів напіврозпаду для HA100K-G6.31 AARR (незабарвлене коло), HA200K-G6.31 AARR (незабарвлений квадрат) і HA300K-G6.31 (незабарвлений трикутник) можна використовувати історичні дані (пофарбовані кола) для rabFab, rabFab-20кДа ПЕГ, rabFab-40кДа ПЕГ і HA100K-rabFab на основі вимірюваних значень Rh.

Детальний опис винаходу

I. ВИЗНАЧЕННЯ

Використовуваний в цьому документі термін "близько" відноситься до звичайного діапазону помилок для відповідного значення, добре відомого фахівцю в цій галузі техніки. Посилання на "близько" значення або параметра в даному документі включає (і описує) варіанти здійснення винаходу, які спрямовані на це значення або параметр per se.

"Акцепторний каркас людини" для цілей цього документа являє собою каркас, що містить амінокислотну послідовність каркаса варіабельного домену легкого ланцюга (VL) або каркаса варіабельного домену важкого ланцюга (VH), які отримано з каркаса імуноглобуліну людини або каркаса консенсусу людини, як визначено нижче. Акцепторний каркас людини, "отриманий з" каркаса імуноглобуліну людини або консенсусної послідовності каркаса людини, може містити амінокислотну послідовність, яка збігається з ними, або може містити зміни амінокислотної послідовності. У деяких варіантах здійснення винаходу, кількість змін амінокислоти становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше або 2 або менше. У деяких варіантах здійснення винаходу, каркас VL-акцептора людини ідентичний в послідовності каркаса VL імуноглобуліну людини або послідовності консенсусного каркаса людини.

"Афінність" відноситься до сили сумарної кількості нековалентних взаємодій між одним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитілом) і її партнером зв'язування (наприклад, антигеном). Якщо не вказано інше, як використовується в цьому документі, "афінність зв'язування" відноситься до афінності власного зв'язування, яка відображає взаємодію 1:1 між членами пари зв'язування (наприклад, антитілом і антигеном). Афінність молекули X для її партнера Y зазвичай може бути представлена константою дисоціації (K_d). Афінність може бути виміряна звичайними методами, відомими в цій галузі, включаючи описані в даному документі. Конкретні ілюстративні та ілюстративні варіанти здійснення винаходу для вимірювання афінності зв'язування описано нижче.

Антитіло з "афінністю, яка дозріла" відноситься до антитіла з одним або більше змінами в одній або більше гіперваріабельних ділянках (HVR) і/або каркасних ділянках (FR) в порівнянні з вихідним антитілом, яке не володіє такими змінами, причому такі зміни призводять до поліпшення спорідненості антитіла до антигену.

Термін "фактор росту ендотелію судин" або "VEGF" відноситься до білка А фактору росту ендотелію судин, як показано в SEQ ID NO: 47 (див. також Swiss Prot Accession № P15692, Gene ID (NCBI): 7422). Термін "VEGF" охоплює білок, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47, а також його гомологи та ізоформи. Термін "VEGF" також відповідає відомим ізоформами, наприклад ізоформами зрощування, VEGF, наприклад VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ і VEGF₂₀₆, разом з їх природними алельними та обробленими формами, включаючи 110-амінокислотний фактор росту ендотеліальних клітин людини, отриманий розщепленням плазміном VEGF₁₆₅, як описано в Ferrara Mol. Biol. Cell. 21:687 (2010), Leung et al., Science, 246:1306 (1989), та Houck et al., Mol. Endocrin., 5: 1806 (1991). Термін "VEGF" також відноситься до VEGF від нелюдських видів, таких як миша, щур або примат. Іноді VEGF від певного виду позначають за допомогою таких термінів, як hVEGF для VEGF людини, mVEGF для VEGF миші тощо. Термін "VEGF" також використовується для позначення усічених форм поліпептиду, що містять амінокислоти від 8 до 109 або від 1 до 109 з 165-амінокислотного фактора росту ендотеліальних клітин людини. Посилання на будь-які такі форми VEGF може бути ідентифіковано в цій заявці, наприклад, за допомогою "VEGF₁₀₉", "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" або "VEGF₁₆₅". Положення амінокислот для "усіченого" нативного VEGF нумеруються, як зазначено в нативній послідовності VEGF. Наприклад, положення амінокислоти 17 (метіонін) в усіченому нативному VEGF є також положенням 17 (метіонін) в нативному VEGF. Усічений нативний VEGF має афінність зв'язування з рецепторами KDR і Flt-1, яку можна порівняти з нативним VEGF. Використовуваний в цьому документі термін "варіант VEGF" відноситься до поліпептиду VEGF, який включає одну або більше амінокислотних мутацій в нативній послідовності VEGF. Необов'язково, одна або більше амінокислотних мутацій включають амінокислотну заміну(и). Для цілей скороченого позначення варіантів VEGF, описаних в цьому документі, зазначається, що числа відносяться до положення амінокислотного залишку амінокислотної послідовності передбачуваного нативного VEGF (представлено в Leung et al., supra і Houck et al., вище). Якщо не вказано інше, термін "VEGF", який використовується в цьому документі, означає VEGF-A.

Терміни "анти-VEGF антитіло", "антитіло, яке зв'язується з VEGF", і "антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF", відносяться до антитілу, яке здатне зв'язувати VEGF з достатньою афінністю, так що антитіло корисно в якості діагностичного і/або терапевтичного агента при націлюванні на VEGF. В одному варіанті здійснення винаходу, ступінь зв'язування анти-VEGF антитіла з непов'язаним не-VEGF білком становить менш ніж близько 10 % від зв'язування антитіла з VEGF, як виміряно, наприклад, радіоімунаналізом (RIA). У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло, яке зв'язується з VEGF, має константу дисоціації (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад від 10^{-9} М до 10^{-13} М). У деяких варіантах здійснення винаходу, анти-VEGF антитіло зв'язується з епітопом VEGF, який зберігається серед VEGF у різних видів.

Термін "антитіло" в цьому документі використовується в самому широкому сенсі і охоплює різні структури антитіл, включаючи, але не обмежуючись ними, моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) і фрагменти антитіл, за умови, що вони мають бажану антиген-зв'язуючу активність.

"Фрагмент антитіла" відноситься до молекули, відмінної від інтактного антитіла, яка містить частину інтактного антитіла, яка зв'язує антиген з яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіл включають, але не обмежуються ними, Fv, Fab, Fab', Fab'-C, Fab'-SH, F(ab')₂; димери; лінійні антитіла; молекули одноланцюгових антитіл (наприклад, scFv); і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл. У деяких випадках приклади фрагментів антитіл включають, але не обмежуються ними, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; димери; лінійні антитіла; молекули одноланцюгових антитіл (наприклад, scFv); і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

Папаїнове перетравлення антитіл дає два ідентичних антигензв'язуючих фрагмента, які називають фрагментами "Fab", і залишковий фрагмент "Fc", позначення, що відображає здатність легко кристалізуватися. Фрагмент Fab складається з цілого легкого (L) ланцюга разом з доменом варіабельної ділянки важкого (H) ланцюга (VH) і першого константного домену одного важкого ланцюга (CH1). Обробка антитіла пепсином дає один великий фрагмент F(ab')₂, який приблизно відповідає двом зв'язаним з дисульфідом Fab-фрагментами, які мають двовалентну антигензв'язуючу активність і як і раніше здатним до зшивання антигену. Fab' фрагменти відрізняються від Fab-фрагментів наявністю декількох додаткових залишків на карбоксильному кінці домену CH1, включаючи один або більше цистеїнів з ділянки шарніра антитіла. Fab-C молекули являють собою Fab молекули, які експресуються таким чином, що

послідовність усікається на першому цистеїні шарніра, даючи Fab з вільним цистеїном безпосередньо після експресії (див., наприклад, Shatz et al., Mol. Pharmaceutics 2016; ідентифікатор PubMed (PMID) 27244474). Наприклад, молекула Fab-C може мати вільний цистеїн в положенні Cys227 важкого ланцюга. В інших випадках молекула Fab-C може мати вільний цистеїн в положенні Cys229 важкого ланцюга. Fab'-SH є позначенням в цьому документі для Fab', в якому залишок(и) цистеїну константних доменів несуть вільну тіольну групу. Фрагменти F(ab')₂ антитіла спочатку були отримані у вигляді пар Fab'-фрагментів, які мають цистеїн шарніра між ними. Відомі також інші хімічні сполуки фрагментів антитіл.

Використовуваний в цьому документі термін "Fc-ділянка" використовується для визначення C-кінцевої ділянки важкого ланцюга імуноглобуліну, яка містить щонайменше частину константної ділянки. Термін включає в себе природні послідовності Fc-ділянок та варіанти Fc-ділянок. В одному варіанті здійснення винаходу, Fc-ділянка важкого ланцюга IgG людини простягається від Cys226 або від Pro230 до карбоксильних кінців важкого ланцюга. Однак C-кінцевий лізін (Lys447) Fc-ділянки може бути присутнім або відсутнім. Якщо не вказано інше, нумерація амінокислотних залишків в Fc-ділянці або константній ділянці відповідає системі нумерації ЄС, також званої індексом ЄС, як описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

"Fv" складається з димеру одного домену варіабельної ділянки важкого і одного легкого ланцюга в щільній, нековалентній асоціації. Зі згортання цих двох доменів походять шість гіперваріабельних петель (по 3 петлі з кожного H і L-ланцюга), які вносять амінокислотні залишки для зв'язування антигену і надають антигензв'язуючу специфічність антитіла. Однак навіть один варіабельний домен (або половина Fv, що містить тільки три HVR, специфічних для антигену), має здатність розпізнавати і зв'язувати антиген, хоча часто з більш низькою спорідненістю, ніж весь сайт зв'язування.

"Одноланцюговий Fv", також скорочується як "sFv" або "scFv", є фрагментами антитіл, які містять домени VH і VL-антитіл, з'єднані в один поліпептидний ланцюг. Переважно, поліпептид sFv додатково містить поліпептидний лінкер між доменами VH і VL, який дозволяє sFv формувати бажану структуру для зв'язування антигену. Для огляду про sFv див. Pluckthun в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Термін "діатіла" відноситься до невеликих фрагментів антитіл, які отримано шляхом конструювання sFv-фрагментів (див. попередній параграф) за допомогою коротких лінкерів (близько 5-10 залишків) між доменами VH і VL, так що утворюються міжланцюгово, але не внутрішньоланцюгово V домени, які спаровуються, що призводить до отримання двовалентного фрагмента, тобто фрагмента, що має дві антигензв'язуючі ділянки. Біспецифічні діатіла є гетеродимерами двох "кросоверних" sFv-фрагментів, в яких VH і VL-домени двох антитіл присутні в різних поліпептидних ланцюгах. Діатіла описані більш повно, наприклад, в EP 404097; WO 93/11161; і Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

"Блокуюче" антитіло або антитіло "антагоніст" являє собою антитіло, яке пригнічує або зменшує біологічну активність пов'язаного з ним антигена. Деякі блокуючі антитіла або антагоністичні антитіла по суті або повністю інгібують біологічну активність антигену.

"Антитіло, яке зв'язується з одним і тим же епітопом" в якості еталонного антитіла відноситься до антитіла, яке блокує зв'язування еталонного антитіла з його антигеном в конкурентному аналізі на 50 % або більше, і навпаки, контрольне антитіло блокує зв'язування антитіла з його антигеном в конкурентному аналізі на 50 % і більше. Ілюстративний конкурентний аналіз наведено в цьому документі.

Термін "химерне" антитіло відноситься до антитіла, в якому фрагмент важкого і/або легкого ланцюга походить з конкретного джерела або виду, в той час як інша частина важкого і/або легкого ланцюга походить з іншого джерела або виду.

"Клас" антитіла відноситься до типу константного домену або константної області, що міститься в його важкому ланцюгу. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і деякі з них можуть бути далі розділені на підкласи (ізотипи), наприклад IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ і IgA₂. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобулінів, називаються, ..., і, відповідно. αβγμ

"Ефекторні функції" відносяться до тієї біологічної активності, яка відноситься до Fc-ділянки антитіла, які варіюються в залежності від ізотипа антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають: C1q-зв'язуюча і комплемент-залежна цитотоксичність (CDC); зв'язування Fc-рецептора; антитіло-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; знижуюча регуляція рецепторів клітинної поверхні (наприклад, рецептор В-клітин); і активації В-клітин.

"Каркас" або "каркасна ділянка" або "FR" відноситься до залишків варіабельної ділянки, які відмінні від залишків гіперваріабельної ділянки (HVR). FR варіабельної ділянки зазвичай складається з чотирьох доменів FR: FR1, FR2, FR3 і FR4.

Терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" і "ціле антитіло" використовуються в цьому документі як взаємозамінні для позначення антитіла, що має структуру, по суті аналогічну структурі нативного антитіла, або мають важкі ланцюги, які містять Fc-ділянку, як визначено в даному документі.

"Людське антитіло" являє собою антитіло людини, яке має амінокислотну послідовність, яка відповідає амінокислотній послідовності антитіла, що продукується людиною або клітиною людини, або отриманої з нелюдського джерела, яке використовує репертуари антитіл людини або інші людські послідовності, що кодують антитіла. Це визначення людського антитіла конкретно виключає гуманізоване антитіло, що містить нелюдські антигензв'язуючі залишки.

"Каркас консенсусу людини" являє собою структуру, яка являє собою амінокислотні залишки, які найбільш часто зустрічаються у вибірці послідовностей каркаса VL або VH людського імунoglobуліну. Як правило, вибір послідовностей VL або VH людського імунoglobуліну походить з підгрупи послідовностей варіабельних доменів. Як правило, підгрупа послідовностей є підгрупою, як в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. В одному варіанті здійснення винаходу, для VL підгрупа є підгрупою каппа I, як в Kabat et al., див. вище. В одному варіанті здійснення винаходу, для VH підгрупа є підгрупою III, як в Kabat et al., див. вище.

"Гуманізовані" форми нелюдських (наприклад, гризунів) антитіл являють собою химерні антитіла, які містять мінімальну послідовність, отриману з нелюдського антитіла. Здебільшого гуманізовані антитіла є людськими імунoglobулінами (антитіло-реципієнт), в яких залишки з гіперваріабельної ділянки реципієнта замінюються залишками з гіперваріабельної ділянки нелюдських видів (донорні антитіла), таких як миші, щур, кролик або нелюдський примат, що мають бажану специфічність антитіл, афінність і здатність. В деяких випадках залишки FR людського імунoglobуліну замінюються відповідними нелюдськими залишками. Крім того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, які не виявлено в антитілі-реципієнті або в донорському антитілі. Ці модифікації зроблені для подальшого поліпшення характеристик антитіл. Загалом, гуманізоване антитіло буде містити по суті все із щонайменше одного і, як правило, двох варіабельних доменів, в яких всі або практично всі гіперваріабельні петлі відповідають нелюдському імунoglobуліну, і всі або практично всі FR є тими послідовностями людського імунoglobуліну. Гуманізоване антитіло необов'язково також буде містити щонайменше частину константної ділянки (Fc) імунoglobуліну, як правило, імунoglobуліну людини. Більш детально див. Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); і Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Термін "варіабельний" відноситься до того факту, що деякі сегменти варіабельних доменів сильно розрізняються за послідовностям серед антитіл. Варіабельний або "V" домен опосередковує зв'язування антигену і визначає специфічність конкретного антитіла для його конкретного антигену. Однак варіабельність розподіляється нерівномірно по всьому діапазону варіабельних доменів. Замість цього V-ділянки складаються з відносно інваріантних відрізків, які називаються каркасними ділянками (FR) з 15-30 амінокислот, розділених більш короткими ділянками екстремальної варіабельності під назвою "гіперваріабельні ділянки", кожна довжиною 9-12 амінокислот. Термін "гіперваріабельна ділянка" або "HVR" при використанні в цьому документі відноситься до амінокислотних залишків антитіла, які відповідальні за антигензв'язування. Гіперваріабельна ділянка зазвичай містить амінокислотні залишки, наприклад, приблизно близько залишків 24-34 (L1), 50-56 (L2) і 89-97 (L3) в VL, і приблизно близько залишків 26-35 (H1), 49-65 (H2) і 95-102 (H3) в VH (в одному варіанті здійснення винаходу, H1 приблизно близько залишків 31-35); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)), та/або ці залишки з "гіперваріабельної петлі" (наприклад, залишки 26-32 (L1), 50-52 (L2) і 91-96 (L3) в VL і 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) в VH; Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Варіабельні домени нативних важких і легких ланцюгів кожен містить чотири FR, в основному застосовуючи конфігурацію бета-листка, зв'язану трьома гіперваріабельними ділянками, які утворюють петлі, що з'єднують і в деяких випадках які складають частину структури бета-листка. Гіперваріабельні ділянки в кожному ланцюзі утримуються разом в безпосередній близькості від FR і, з гіперваріабельними ділянками з іншого ланцюга сприяють утворенню антигензв'язуючого сайту антитіл (див. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Відповідно, послідовності HVR і FR зазвичай з'являються в наступній послідовності в VH (або

VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. Константні домени безпосередньо не пов'язані зі зв'язуванням антитіла з антигеном, але виявляють різні ефекторні функції, такі як участь антитіла в залежній від антитіла клітинної цитотоксичності (ADCC).

Термін "нумерація залишків варіабельного домену, як в Кабат" або "нумерація амінокислотного положення, як в Кабат", і їх варіації відносяться до системи нумерації, використовуваної для варіабельних доменів важкого ланцюга або варіабельних доменів легкого ланцюга для компіляції антитіл в Kabat et al., див. вище. Використовуючи цю систему нумерації, фактична лінійна амінокислотна послідовність може містити менше або додаткові амінокислоти, які відповідають скороченню або вставці в FR або HVR варіабельного домену. Наприклад, варіабельний домен важкого ланцюга може включати одну амінокислотну вставку (залишок 52a по Кабат) після залишку 52 з H2 і вставлені залишки (наприклад, залишки 82a, 82b і 82c і т. д. згідно Кабат) після залишку 82 важкого ланцюга FR. Нумерація залишків по Кабат може бути визначена для даного антитіла шляхом вирівнювання в ділянках гомології послідовності антитіла зі "стандартною" нумерацією послідовності по Кабат.

Система нумерації Кабат зазвичай використовується при зверненні до залишку в варіабельній ділянці (приблизно залишки 1-107 легкого ланцюга і залишки 1-113 важкого ланцюга) (наприклад, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). "Система нумерації ЄС" або "індекс ЄС" зазвичай використовується при зверненні до залишку в константній ділянці важкого ланцюга імуноглобуліну (наприклад, індекс ЄС, зазначений в Kabat et al., Вище). "Індекс ЄС як в Кабат" відноситься до нумерації залишків людського IgG1-антитіла ЄС. Якщо не вказано інше в цьому документі, посилання на номери залишків в варіабельному домені антитіл означають нумерацію залишку по системі нумерації Кабата. Якщо не вказано інше в цьому документі, посилання на номери залишків в константному домені антитіл означають нумерацію залишку по системі нумерації ЄС (наприклад, див. попередню заявку Сполучених Штатів № 60/640323, фігури для нумерації ЄС).

Якщо не вказано інше, залишки HVR та інші залишки в варіабельному домені (наприклад, залишки FR) пронумеровані в цьому документі відповідно до Kabat et al., див. вище.

"Імунокон'югат" являє собою антитіло, кон'юговане з однією або більше гетерологічними молекулами(ой), включаючи, але не обмежуючись ними, цитотоксичний агент.

Термін "ізольоване антитіло" при використанні для опису різних антитіл, описаних в цьому документі, означає антитіло, яке було ідентифіковано та виділено і/або виділено з клітини або клітинної культури, з якої вона була експресована. Забруднюючими компонентами його природного середовища є матеріали, які зазвичай перешкоджають діагностичному або терапевтичному застосуванню поліпептиду і можуть включати ферменти, гормони і інші білкові або небілкові розчинені речовини. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло очищають до більш ніж 95 % або 99 % чистоти, як визначено, наприклад, електрофоретично (наприклад, SDS-PAGE, ізоелектричне фокусування (IEF), капілярний електрофорез) або хроматографічно (наприклад, іонний обмін або ВЕРХ з оберненою фазою). Для огляду методів оцінки чистоти антитіл див., наприклад, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848: 79-87 (2007). У кращих варіантах здійснення винаходу, антитіло буде очищено (1) до ступеня, достатнього для отримання щонайменше 15 залишків N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності з використанням сіквенатора з обертовою склянкою або (2) до гомогенності за допомогою SDS-PAGE в невідновлюваних або відновлюваних умовах, використовуючи забарвлення Кумасі синім або, переважно, сріблом. Ізольоване антитіло включає антитіла in situ в рекомбінантних клітинах оскільки щонайменше один компонент поліпептидного природного середовища не буде присутній. Однак зазвичай ізольований поліпептид отримують за допомогою щонайменше однією стадією очищення.

Використовуваний в цьому документі термін "моноклональне антитіло" відноситься до антитіла, отриманого з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, що містяться в популяції, є ідентичними та/або зв'язують один і той же епітоп, за винятком можливих варіантів антитіл, наприклад, що містять природні виникаючі мутації або які виникають при отриманні препарату моноклонального антитіла, причому такі варіанти зазвичай присутні в незначних кількостях. На відміну від препаратів поліклонального антитіла, які зазвичай включають різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло препарату моноклонального антитіла спрямовано проти одного детермінанта на антигені. Таким чином, модифікатор "моноклональне" вказує на те, що антитіло отримують з практично однорідної популяції антитіл; його не слід інтерпретувати як вимогу щодо продукції антитіла за допомогою будь-якого конкретного способу. Наприклад, моноклональні антитіла, які будуть використовуватися відповідно до цього винаходу, можуть бути отримані різними способами,

включаючи, але не обмежуючись ними, гібридомний спосіб, способи рекомбінантної ДНК, способи фагового дисплею і способи, які використовують трансгенних тварин, що містять всі або частину локусів імуноглобуліну людини, такі способи та інші ілюстративні способи отримання моноклональних антитіл, описаних в даному документі.

- 5 Термін "мультиспецифічне антитіло" використовується в самому широкому сенсі і конкретно охоплює антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) і варіабельний домен легкого ланцюга (VL), де одиниця VH-VL володіє поліепітопічною специфічністю (тобто здатна зв'язуватися з двома різними епітопами на одній біологічній молекулі або на кожному епітопі на іншій біологічній молекулі). Такі мультиспецифічні антитіла включають, але не обмежуються
- 10 ними, повнорозмірні антитіла, антитіла, що мають два або більше доменів VL і VH, фрагменти антитіл, такі як Fab, Fab', FAB-C, Fv, dsFv, scFv, діатіла, біспецифічні діатіла і триатіла, фрагменти антитіл, які були зв'язані ковалентно або нековалентно. "Поліепітопічна специфічність" відноситься до здатності специфічно зв'язуватися з двома або більше різними епітопами на одній і тій же або інших цілі(ях). "Подвійна специфічність" або "біспецифічність"
- 15 відноситься до здатності специфічно зв'язуватися з двома різними епітопами на одній і тій же або інших цілі(ях). Однак, на відміну від біспецифічних антитілах, подвійні специфічні антитіла мають два антигензв'язуючих плеча, які ідентичні в амінокислотній послідовності, і кожне Fab-плече здатне розпізнавати два антигена. Подвійна специфічність дозволяє антитілам взаємодіяти з високою афінністю з двома різними антигенами, як з одним Fab або молекулою
- 20 IgG. Згідно з одним варіантом здійснення винаходу, мультиспецифічне антитіло в формі IgG1 зв'язується з кожним епітопом з афінністю від 5 мкМ до 0,001 нМ, від 3 мкМ до 0,001 нМ, від 1 мкМ до 0,001 нМ, від 0,5 мкМ до 0,001 нМ або від 0,1 мкМ до 0,001 нМ. "Моноспецифічність" відноситься до здатності зв'язувати тільки один епітоп.
- "Нативні антитіла" відносяться до природних молекул імуноглобуліну з різними структурами.
- 25 Наприклад, нативні IgG-антитіла зазвичай являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни з молекулярною масою близько 150000 дальтон, що складаються з двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів, пов'язаних дисульфідними зв'язками. Кожен важкий ланцюг від N-кінця до C-кінця містить варіабельну ділянку (VH), також який називається важким варіабельним доменом або варіабельним доменом важкого ланцюга, а потім три константних
- 30 домена (CH1, CH2 і CH3). Аналогічно, кожен легкий ланцюг від N-кінця до C-кінця містить варіабельну ділянку (VL), також який називається легким варіабельним доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, а потім константний легкий домен (CL). Легкий ланцюг антитіла може бути призначено одному з двох типів, який називається каппа (κ) і лямбда (λ), на основі амінокислотної послідовності його константного домену.
- 35 Що стосується зв'язування антитіла з молекулою-мішенню, термін "специфічне зв'язування" або "специфічно зв'язується з" або "специфічний для" конкретного поліпептиду або епітопу на конкретній поліпептидній мішені означає зв'язування, яке помітно відрізняється від неспецифічної взаємодії. Специфічне зв'язування може бути виміряно, наприклад, шляхом визначення зв'язування молекули в порівнянні зі зв'язуванням контрольної молекули.
- 40 Наприклад, специфічне зв'язування може бути визначено шляхом конкуренції з контрольною молекулою, яка схожа на мішень, наприклад, надлишок неміченої мішені. В цьому випадку специфічне зв'язування вказується, якщо зв'язування міченої мішені з зондом конкурентно інгібується надлишковою неміченою мішенню. Термін "специфічне зв'язування" або "специфічно зв'язується з" або "специфічний для" конкретного поліпептиду або епітопу на конкретній
- 45 поліпептидній мішені, як використовується в цьому документі, може бути представлений, наприклад, за допомогою молекули, що має Kd для мішені 10^{-4} М або нижче, альтернативно 10^{-5} М або нижче, альтернативно 10^{-6} М або нижче, альтернативно 10^{-7} М або нижче, альтернативно 10^{-8} М або нижче, альтернативно 10^{-9} М або нижче, альтернативно 10^{-10} М або нижче, альтернативно 10^{-11} М або нижче, альтернативно 10^{-12} М або нижче або Kd в діапазоні від 10^{-4} М
- 50 до 10^{-6} М або від 10^{-6} М до 10^{-10} М або 10^{-7} М до 10^{-9} М. Як буде зрозуміло фахівцю в цій галузі, афінність і значення Kd обернено пропорційні. Висока афінність до антигену вимірюється низьким значенням Kd. В одному варіанті здійснення винаходу, термін "специфічне зв'язування" відноситься до зв'язування, де молекула зв'язується з конкретним поліпептидом або епітопом на конкретному поліпептиді без істотного зв'язування з будь-яким іншим поліпептидним або
- 55 поліпептидним епітопом.
- "Нуклеїнова кислота, що кодує анти-VEGF антитіло", відноситься до однієї або більше молекул нуклеїнової кислоти, що кодує важкі і легкі ланцюги антитіла (або їхні фрагменти), включаючи таку молекулу(и) нуклеїнової кислоти в одному векторі окремому векторі, і таку молекулу(и) нуклеїнової кислоти, присутню в одному або більше місцях в клітині-хазяїні.

Використовуваний в цьому документі, термін "вектор" відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, здатної поширювати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона зв'язана. Зазначений термін включає вектор, що знаходиться у вигляді нуклеїнової кислоти, що самореplikується, а також вектор, здатний проникати в геном клітини-хазяїна, в яку його вводять. Деякі вектори здатні

управляти експресією нуклеїнових кислот, з якими вони функціонально зв'язані. Такі вектори згадуються в цьому документі як "вектори експресії". Терміни "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїв" і "культура клітин-хазяїв" використовуються як взаємозамінні і відносяться до клітин, в які була введена екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство таких клітин. Клітини-хазяї включають "трансформанти" і "трансформовані клітини", які включають первинно трансформовані клітини і отримане від них потомство, незалежно від кількості пасажів. Потомство може не бути повністю ідентичним вихідній клітині за змістом нуклеїнових кислот, і може містити мутації. Мутантні потомства, які володіють тією ж функцією або біологічною активністю, що і скриновані або обрані в спочатку трансформованій клітині, включені в цей документ.

"Ідентифікація амінокислотної послідовності у відсотках (%)» відносно еталонної поліпептидної послідовності визначається як відсоток амінокислотних залишків в послідовності-кандидаті, які ідентичні амінокислотним залишкам в еталонній поліпептидній послідовності після вирівнювання послідовностей і введення прогалів, якщо необхідно, для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовності, і без урахування будь-яких консервативних замін як частини ідентичності послідовності. Вирівнювання для цілей визначення відсотка ідентичності амінокислотної послідовності може бути досягнуто різними способами, які входять до компетенції фахівця в цій галузі, наприклад, з використанням загальнодоступного комп'ютерного програмного забезпечення, такого як BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Фахівці в цій галузі техніки можуть визначити відповідні параметри вирівнювання послідовностей, включаючи алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині порівнюваних послідовностей. У той же час всі використовувані для цілей цього документа відсоткові значення ідентичності амінокислотних послідовностей отримані із застосуванням комп'ютерної програми для порівняння послідовностей ALIGN-2. Комп'ютерна програма для порівняння послідовностей ALIGN-2 розроблена компанією Genentech, Inc., а вихідний код представлений в документації користувача в Бюро з охорони авторських прав США, Вашингтон, округ Колумбія., 20559, де він зареєстрований відповідно до номера реєстрації авторського права США TXU510087. Програма ALIGN-2 знаходиться у вільному доступі в Genentech, Inc., Саут-Сан-Франциско, Каліфорнія, або може бути скопійована з вихідного коду. Програму ALIGN-2 слід компілювати для застосування в операційній системі UNIX, включаючи цифрову версію UNIX V4. 0D. Всі параметри порівняння послідовностей встановлюються програмою ALIGN-2 і залишаються незмінними.

У ситуаціях, коли ALIGN-2 використовується для порівняння амінокислотних послідовностей, % ідентичності послідовності амінокислот даної амінокислотної послідовності А з або проти даної амінокислотної послідовності В (яка може альтернативно бути виражена як ця амінокислотна послідовність А, яка має або містить певний % ідентичності амінокислотної послідовності з або проти цієї амінокислотної послідовності В), розраховується наступним чином: 100 раз на фракцію X/Y, де X - кількість амінокислотних залишків, порівняних як ідентичні збіги за допомогою програми вирівнювання послідовності ALIGN-2 в цій програмі вирівнювання А і В, і де Y - загальна кількість амінокислотних залишків в В. Буде зрозуміло, що якщо довжина амінокислотної послідовності А не дорівнює довжині амінокислотної послідовності В, % ідентичності амінокислотної послідовності А до В не буде відповідати % ідентичності амінокислотної послідовності В з А. Якщо не вказано інше, всі значення % ідентичності амінокислотної послідовності, використовувані в цьому документі, отримують, як описано в безпосередньо попередній частині, використовуючи комп'ютерну програму ALIGN-2.

Використовуваний в цьому документі термін "введення" означає спосіб введення дози сполуки (наприклад, анти-VEGF антитіла по винаходу, кон'югата антитіла по винаходу, злитого білка даного винаходу, полімерної композиції винаходу, або нуклеїнової кислоти, що кодує анти-VEGF антитіло даного винаходу) або композиції (наприклад, фармацевтичну композицію, наприклад фармацевтичну композицію, що включає анти-VEGF антитіло даного винаходу, кон'югат антитіла по винаходу, злитий білок по винаходу або полімерну композицію по винаходу) суб'єкту. Композиції, які використовуються в описаних в цьому документі способах, можуть бути введені, наприклад, інтравітреально (наприклад, шляхом інтравітреальної ін'єкції), очними краплями, внутрішньом'язово, внутрішньовенно, інтрадермально, черезшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньоочеревно, внутрішньовогнищно, внутрішньочерепно, внутрішньосуглобово, внутрішньопростатно, внутрішньоплеврально, внутрішньотрахеально,

інтратекально, інтраназально, вагінально, інтраректально, місцево, внутрішньопухлинно, перитонеальному, підшкірно, субкон'юнктивно, інтравезикулярно, слизисто, інтраперикардіально, внутрішньопуповинно, внутрішньоочно, інтраорбітально, орально, місцево, трансдермально, шляхом інгаляції, шляхом ін'єкції, шляхом імплантації, шляхом інфузії, шляхом безперервної інфузії, безпосередньо локалізованими перфузійними ваннами клітин-мішеней, катетером, лаважем, кремами або ліпідними композиціями. Композиції, які використовуються в описаних в цих документах способах, також можуть вводитися системно або локально. Спосіб введення може варіюватися в залежності від різних факторів (наприклад, з'єднання, яке вводиться, або композиції і тяжкості стану, захворювання або розлади, які

піддаються лікуванню). "Ангіогенез" відноситься до процесу, за допомогою якого нові кровоносні судини формуються з раніше існуючих кровоносних судин. Ангіогенез відрізняється від васкулогенезу, який є утворенням de novo ендотеліальних клітин з попередників клітин мезодерми. Розлади, пов'язані з патологічним ангіогенезом, можуть бути піддані лікуванню композиціями і способами даного винаходу. Ці розлади включають як неопластичні порушення, так і клітинні проліферативні розлади. Клітинні проліферативні розлади включають, але не обмежуються перерахованими нижче. Не-неопластичні розлади включають, але не обмежуються ними, окулярні стани (не обмежуючі окулярні стани включають, наприклад, ретинопатію, включаючи проліферативну діабетичну ретинопатію, хоріоїдальну неоваскуляризацію (CNV), дегенерацію жовтої плями пов'язану з віком (AMD), діабетичну і інші пов'язані з ішемією ретинопатії, діабетичний макулярної набряк (DME), патологічну короткозорість, хворобу фон Хиппель-Ліндау, гістоплазмоз ока, оклюзію вени сітківки (включаючи центральні (CRVO) і розгалужені (BRVO) форми), неоваскуляризацію рогівки, неоваскуляризацію сітківки, ретинопатію недоношених (ROP), родинну ексудативну вітреоретинопатію (FEVR), хворобу Коутса, хворобу Норрі, синдром остеопорозу і псевдогліому (OPPG), субкон'юнктивальний крововилив, рубеоз, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярну глаукому і гіпертонічну ретинопатію), аутоімунні захворювання (наприклад, ревматоїдний артрит (РА), псоріаз, анкілозуючий спондиліт і запальне захворювання кишечника (наприклад, хвороба Крона і виразковий коліт)), небажану або аберрантну гіпертрофію, артрит, псоріатичний артрит, псоріатичні бляшки, саркоїдоз, атеросклероз, атеросклеротичні бляшки, артеріальний артеріосклероз, судинний рестеноз, артеріовенозні мальформації (AVM), менінгіому, гемангіому, ангіофіброму, гіперплазію щитовидної залози (включаючи хворобу Грейва), трансплантацію рогівки та іншої тканини, запалення легень, гостру травму легень/ГРДС, сепсис, первинну легеневу гіпертензію, злоякісні виділення з легень, набряк головного мозку (наприклад, пов'язаний з гострим інсультом/закритій травмі голови/травми), синовіальне запалення, формування паннуса в РА, осцифікуючий міозит, утворення гіпертрофних кісток, остеоартрит (ОА), рефрактерний асцит, полікістозну хворобу яєчників, ендометріоз, 3-й інтервал флюїдних захворювань (панкреатит, синдром міжфасціального простору, опіки, захворювання кишечника), хронічну астму, міому матки, передчасні пологи, хронічне запалення, таке як IBD (хвороба Крона і виразковий коліт), запальні захворювання нирок (включаючи гломерулонефрит, особливо месангіопрولیферативний гломерулонефрит, гемолітичний уремичний синдром, діабетична нефропатія та гіпертонічний нефросклероз), захворювання, що виникають після трансплантації, відторгнення алотрансплантату нирок, запальні захворювання, нефротичний синдром, небажаний або аберантний ріст маси тканини (не ракові), гемофільні суглоби, гіпертрофічні рубці, інгібування росту волосся, синдром Ослера-Вебера, ретролєтальну фіброплазію піогенної гранульоми, склеродермію, трахому, судинні спайки, синовіт, дерматит, прееклампсію, асцит, випіт перикарду (наприклад, пов'язаний з перикардитом) і плевральний випіт. Додаткові окулярні розлади описані нижче.

Інші розлади, які можуть бути пов'язані з патологічним ангіогенезом, включають в себе незрощення переломів (переломи, які не загоюються), піогенну гранульому, трахому, гемофільну артропатію, судинні спайки і гіпертрофічні рубці, відторгнення трансплантата, фіброваскулярну тканину, акне розацеа, синдром набутого імунного дефіциту, оклюзію артерії, атопічний кератит, бактеріальні виразки, хворобу Бехеті, каротидну обструктивну хворобу, хронічне запалення, хронічне відшарування сітківки, хронічний увеїт, хронічний вірит, зношування контактних лінз, відторгнення трансплантата рогівки, неоваскуляризацію рогівки трансплантата, хворобу Елеса, епідемічний кератокон'юнктивіт, грибові виразки, інфекції Herpes simplex, інфекції Herpes zoster, синдроми гіперв'язкості, саркому Капоші, лейкемію, дегенерацію ліпідів, хворобу Лайма, маргінальний кератоліз, виразку Морен, інфекції Mycobacteria, відмінні від прокази, міопію, ямку диска зорового нерва, остеоартрит, хворобу Педжета, парспланіт, пемфігоїд, фліктенульозний кон'юнктивіт, поліартеріїт, постлазерні

ускладнення, інфекції простіших, еластичну псевдоксантому, птеригій і синдром сухого ока, радіальну кератотомію, ретролентальну фіброплазію, саркоїдоз, склерит, серповидноклітинну анемію, синдром Шегрена, хворобу Старгарта, хворобу Стівена-Джонсона, верхній лімбальний кератокон'юнктивіт, сифіліс, системний вовчак, крайову дегенерацію Террієна, токсоплазмоз, травму, оклюзію вен, дефіцит вітаміну А і саркоїдоз Вегенера, небажаний ангіогенез, пов'язаний з діабетом, паразитарне захворювання, аномальне загоєння ран, гіпертрофію після операції, пошкодження або травму, інгібування росту волосся, інгібування овуляції і утворення жовтого тіла, пригнічення імплантації та інгібування розвитку ембріонів в матці.

Використовуваний в цьому документі термін "окулярний розлад" включає будь-який окулярний розлад (також згадується в цьому документі взаємозамінно як "окулярний стан"), пов'язане з патологічним ангіогенезом. Окулярний розлад може характеризуватися зміненою або нерегульованою проліферацією і/або інвазією нових кровоносних судин в структури очних тканин, таких як сітківка або рогівка. Не обмежуючі окулярні розлади включають, наприклад, AMD (наприклад, волога AMD, суха AMD, проміжна AMD, прогресуюча AMD і географічна атрофія (GA)), дегенерацію жовтої плями, набряк макули, DME (наприклад, фокальний, нецентральних DME і дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (DR) (наприклад, проліферативну DR (PDR), непроліферативну DR (NPDR) і висотну DR), інші пов'язані з ішемією ретинопатії, ROP, оклюзію вени сітківки (RVO) (наприклад, центральну (CRVO) і розгалужену (BRVO) форми), CNV (наприклад, міопічну CNV), неоваскуляризацію рогівки, захворювання, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, захворювання, пов'язані з ретинальною/хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічну короткозорість, хворобу фон Хиппель-Ліндау, гістоплазмоз ока, FEVR, хворобу Коутса, хворобу Норрі, OPPG, субкон'юнктивальний крововилив, рубеоз, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярну глаукому, пігментний ретиніт (RP), гіпертонічну ретинопатію, ангіоматозну проліферацію сітківки, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію зіниці, внутрішньоочну неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, цистоїдний макулярної набряк (CME), васкуліт, папілломеду, ретиніт, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт, амавроз Лебера (також відомий як вроджений амароз Лебера або LCA), увеїт (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, багатофокальний хоріоїдит), гістоплазмоз ока, блефарит, сухість очей, травматичне пошкодження очей, хвороба Шегрена і інші офтальмологічні захворювання, які відрізняються тим, що захворювання або розлад пов'язані з неоваскуляризацією очей, пропотіванням рідини крізь судини і/або набряк сітківки. Додаткові ілюстративні окулярні розлади включають захворювання, пов'язані з рубеозом (неоваскуляризацію кута) і захворювання, викликані аномальною проліферацією судинно-волоконистої або фіброзної тканини, включаючи всі форми проліферативної вітреоретинопатії.

Ілюстративні захворювання, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, включають в себе, але не обмежуються ними, епідемічний кератокон'юнктивіт, дефіцит вітаміну А, зношування контактних лінз, атопічний кератит, верхній лімбальний кератокон'юнктивіт, птеригій і синдром сухого ока, синдром Шегрена, акне розацеа, фліктенульозний кон'юнктивіт, сифіліс, інфекції *Mycobacteria*, ліпідну дегенерацію, хімічні опіки, бактеріальні виразки, грибкові виразки, інфекції *Herpes simplex*, інфекції *Herpes zoster*, інфекції простіших, саркома Капоші, виразка Морена, маргінальна дегенерація Террієна, маргінальний кератоліз, ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, поліартеріїт, травму, саркоїдоз Вегенера, склерит, синдром Стівенса-Джонсона, перифігійну радіальну кератотомію і відторгнення трансплантата рогівки.

Ілюстративні захворювання, пов'язані з ретинальною/хоріоїдальною неоваскуляризацією, включають, але не обмежуються ними, діабетичну ретинопатію, дегенерацію жовтої плями, серповидноклітинну анемію, саркоїдоз, сифіліс, еластичну псевдоксантому, хворобу Педжета, оклюзію вен, оклюзію артерії, каротидну обструктивну хворобу, хронічний увеїт/вітрит, мікобактеріальні інфекції, хворобу Лайма, системний червоний вовчак, ретинопатію недоношених, пігментну дистрофію сітківки, набряк сітківки (включаючи набряк макули), хворобу Елеса, хворобу Бехчета, інфекції, що викликають ретиніт або хоріоїдит (наприклад, мультифокальні судинні порушення), синдром передбачуваного гістоплазмозу очей, хворобу Беста (вітеловидна дегенерація жовтої плями), короткозорість, ямки диска зорового нерва, хвороба Старгарта, парспланіт, відшарування сітківки (наприклад, хронічне відшарування сітківки), синдроми гіперв'язкості, токсоплазмоз, травму і ускладнення після лазера.

"Розлади, пов'язані з небажаною судинною проникністю", як використовується в цьому документі, включають, наприклад, набряк, пов'язаний з пухлинами головного мозку, асцит, пов'язаний зі злоякісними новоутвореннями, синдром Мейгса, запалення легенів, нефротичний

синдром, перикардіальний випіт, плевральний випіт, проникність, пов'язану з серцево-судинними захворюваннями такими як стан після інфарктів міокарда та інсультів тощо. Слід розуміти, що описані вище класифікації не є взаємовиключними, і розлад може підпадати під декілька категорій.

- 5 Терміни "клітинний проліферативний розлад" і "проліферативний розлад" відносяться до розладів, які пов'язані з деяким ступенем аномальної клітинної проліферації. В одному варіанті здійснення винаходу, клітинний проліферативний розлад являє собою рак.
- Терміни "рак", "раковий", "клітинний проліферативний розлад", "проліферативний розлад" і "пухлина" не є взаємовиключними, як зазначено в цьому документі.
- 10 "Пухлина", як використовується в цьому документі, відноситься до всього росту і поширенню пухлинних клітин, будь то злоякісні або доброякісні, і все передракові і ракові клітини і тканини.
- "Ангіогенним фактором або агентом" є фактор росту, який стимулює розвиток кровоносних судин, наприклад, сприяє ангиогенезу, росту ендотеліальних клітин, стабілізації кровоносних судин і/або васкулогенезу і т. д. Наприклад, ангиогенні чинники включають, але не обмежуються
- 15 ними, наприклад, VEGF і членів сімейства VEGF, PlGF, сімейство PDGF, сімейство факторів росту фібробластів (FGF), ліганди TIE (ангіопоетина), ефрин, Del-1, фібробласти факторів зростання: кислий (aFGF) і основний (bFGF), фоллістатин, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (G-CSF), фактор росту гепатоцитів (HGF)/фактор розсіювання (SF), інтерлейкін-8 (IL-8), лептин, мідкін, плацентарний фактор росту, фактор росту ендотеліальних клітин, отриманий з тромбоцитів (PD-ECGF), фактор росту, отриманий з
- 20 тромбоцитів, особливо PDGF-BB або PDGFR-бета, плейотрофін (PTN), програнулін, проліферін, трансформуючий фактор росту-альфа (TGF-альфа), трансформуючий фактор росту-бета (TGF-бета), фактор некрозу пухлини-альфа (TNF-альфа), фактор росту ендотелію судин (VEGF)/фактор судинної проникності (VPF) і т. д. Вони також включають фактори, які
- 25 прискорюють загоєння ран, такі як гормон росту, інсуліноподібний фактор росту-I (IGF-I), VIGF, епідермальний фактор росту (EGF), CTGF і члени його сімейства, а також TGF-альфа і TGF-бета. Див., наприклад, Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5 (12): 1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22: 6549-6556 (2003) (наприклад, в таблиці 1 перераховані відомі
- 30 ангиогенні фактори); і Sato, *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003).
- "Агент проти ангиогенезу" або "інгібітор ангиогенезу" відноситься до речовини з невеликою молекулярною вагою, полінуклеотиду, поліпептиду, ізолюваному білку, рекомбінантному білку, антитіла або кон'югатів або його злитим білкам, який пригнічує ангиогенез, васкулогенез, або
- 35 небажану судинну проникність, прямо або побічно. Слід розуміти, що агент проти ангиогенезу включає ті агенти, які пов'язують і блокують ангиогенну активність ангиогенного фактора або його рецептора. Наприклад, агент проти ангиогенезу являє собою антитіло або інший антагоніст до ангиогенного агенту, як визначено вище, наприклад антагоністи VEGF (наприклад, антитіла до VEGF-A або до рецептора VEGF-A (наприклад, KDR-рецептора або Flt-1 рецептора)),
- 40 антагоністи PDGF (наприклад, анти-PDGFR інгібітори, такі як GLEEVEC[™] (імаїнібу мезилат)).
- Агенти проти ангиогенезу також включають нативні інгібітори ангиогенезу, наприклад ангиостатин, ендостатин і т. д. Див., наприклад, Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003) (наприклад, в Таблиці 3 перераховані анти-
- 45 ангиогенні терапії злоякісної меланоми); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5 (12): 1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22: 6549-6556 (2003) (наприклад, в таблиці 2 перераховані відомі антиангиогенні фактори); і Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003) (наприклад, в таблиці 1 перераховані антиангиогенні агенти, які використовуються в клінічних випробуваннях).
- Використовуваний в цьому документі термін "антагоніст VEGF" відноситься до молекули, здатної зв'язуватися з VEGF, зменшуючи рівні експресії VEGF або нейтралізуючи, блокуючи, пригнічуючи, анулюючи, зменшуючи або перешкоджаючи біологічній активності VEGF,
- 50 включаючи, але не обмежуючись ними, VEGF-зв'язування з одним або більше рецепторами VEGF, VEGF сигналінг і опосередкований VEGF ангиогенез і виживання або проліферацію ендотеліальних клітин. Наприклад, молекула, здатна нейтралізувати, блокувати, пригнічувати, анулювати, відновлювати або перешкоджати біологічній активності VEGF, може надавати свою дію шляхом зв'язування з одним або більше рецепторами VEGF (VEGFR) (наприклад, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, пов'язаним з мембраною VEGF рецептора (mbVEGFR) або розчиненого
- 55 рецептора VEGF (sVEGFR)). В якості антагоністів VEGF, корисних в способах цього винаходу, виступають поліпептиди, які специфічно зв'язуються з VEGF, антитілом проти VEGF і їх антигензв'язуючі фрагменти, молекули рецептора і похідні, які специфічно зв'язуються з VEGF, таким чином запобігаючи його зв'язуванню з одним або більше рецепторами, злиті білки (наприклад, VEGF-Trap (регенерон)) і VEGF₁₂₁-гелонін (перегрін). Антагоністи VEGF також
- 60

включають варіанти антагоністів поліпептидів VEGF, олігомери антисмислових нуклеотидних груп, комплементарні щонайменше фрагменту молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид VEGF; малі РНК, комплементарні щонайменше фрагменту молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид VEGF; рибозими, які націлені на VEGF; пептидні антитіла до VEGF; і VEGF-аптамери. Антагоністи VEGF також включають поліпептиди, які зв'язуються з VEGFR, антитілами проти VEGFR і їх антигензв'язуючими фрагментами, і похідними, які зв'язуються з VEGFR, тим самим блокуючи, інгібуючи, анулюючи, зменшуючи або перешкоджаючи біологічній активності VEGF (наприклад, VEGF сигналінг) або злиття білків. Антагоністи VEGF також включають непептидні малі молекули, які зв'язуються з VEGF або VEGFR і здатні блокувати, інгібувати, анулювати, зменшувати або заважати біологічній активності VEGF. Таким чином, термін "активність VEGF" конкретно включає в себе VEGF-опосередковану біологічну активність VEGF. У деяких варіантах здійснення винаходу, антагоніст VEGF знижує або інгібує на щонайменше 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або більше, рівень експресії або біологічну активність VEGF. У деяких варіантах здійснення винаходу, VEGF, інгібований специфічним VEGF антагоністом, являє собою VEGF (8-109), VEGF (1-109) або VEGF₁₆₅.

Використовувані в цьому документі антагоністи VEGF можуть включати, але не обмежуються ними, антитіла проти VEGFR2 і зв'язані з ними молекули (наприклад, рамуцирумаб, танібірумаб, афліберцепт), антитіла проти VEGFR1 і пов'язані з ними молекули (наприклад, ікрукумаб, афліберцепт (VEGF Trap-Eye; EYLEA®) і зів-афліберцепт (VEGF Trap; ZALTRAP®)), біспецифічні антитіла VEGF (наприклад, MP-0250, вануцизумаб (VEGF-ANG2) і біспецифічні антитіла, описані в US 2001/0236388), біспецифічні антитіла, включаючи комбінації двох анти-VEGF, анти-VEGFR1 і анти-VEGFR2 плечі, антитіла проти VEGF (наприклад, бевацизумаб, севацизумаб і ранібізумаб) і антагоністи VEGF з непептидною малою молекулою (наприклад, пазопаніб, акситиніб, вандетаніб, стиварга, кабозантиніб, ленватиніб, нінтеданіб, орантиніб, телатиніб, довітиніг, цедіраніб, мотесаніб, сульфатиніб, апатиніб, форетиніб, фамітиніб і тівозаніб). Додаткові антагоністи VEGF описані нижче.

"Ефективна кількість" агента, наприклад, фармацевтичної композиції, відноситься до кількості, ефективному в дозуваннях і протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного терапевтичного або профілактичного результату.

"Індивід" або "суб'єкт" являє собою ссавців. Ссавці включають, але не обмежуються ними, домашніх тварин (наприклад, корів, овець, кішок, собак і коней), приматів (наприклад, людей і нелюдських приматів, таких як мавпи), кроликів і гризунів (наприклад, мишей і щурів). У деяких варіантах здійснення винаходу, індивідуум або суб'єкт являє собою людину. "Суб'єкт" може бути "пацієнтом".

Терміни "рак" і "ракові" відносяться до фізіологічного стану у ссавців або описують їх фізіологічний стан, яке зазвичай характеризується нерегульованим ростом клітин. Приклади раку включають, але не обмежуються ними, карциному, лімфому, бластому, саркому і лейкоз. Більш конкретні приклади таких раків включають плоскоклітинний рак, дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, гліобластому, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак товстої кишки, колоректальний рак, рак ендометрію, рак слинних залоз, рак нирок, рак нирки, рак передміхурової залози, рак вульви, рак щитовидної залози, гепатокарциному і різні типи раку голови і шиї. "Ссавець" для цілей лікування відноситься до будь-якої тварини, класифікованій як ссавець, включаючи людей, домашніх і сільськогосподарських тварин, нелюдських приматів і тварин зоопарків, спортивних або домашніх тварин, таких як собаки, коні, кішки, корови і т. д.

"Розлад" - це будь-який стан, який може бути покращено при лікуванні антитілом. Наприклад, ссавці, які страждають або потребують профілактики від аномального ангиогенезу (надмірний, неадекватний або неконтрольований ангиогенез) або судинної проникності. Це включає хронічні і гострі розлади або захворювання, включаючи ті патологічні стани, які прихилиють ссавців до розладу, який розглядався. Необмежуючі приклади розладів, що підлягають лікуванню, включають в себе розлади, пов'язані з патологічним ангиогенезом (наприклад, окулярні розлади і клітинні проліферативні розлади) і розлади, пов'язані з небажаною проникністю судин.

Термін "протинеопластична композиція" відноситься до композиції, придатної для лікування раку, що містить щонайменше один активний терапевтичний агент, наприклад "протираковий агент". Приклади терапевтичних агентів (протиракових агентів) включають, але обмежуються ними, наприклад, хіміотерапевтичні агенти, агенти інгібітору росту, цитотоксичні агенти, агенти, які використовуються в променевій терапії, агенти проти ангиогенезу, апоптозні агенти, протитуберкулінові агенти і інші агенти для лікування раку, такі як антитіла проти HER-2, анти-

CD20-антитіла, антагоніст рецептора епідермального фактора росту (EGFR) (наприклад, інгібітор тирозинкінази), інгібітор HER1/EGFR (наприклад, ерлотиніб (TARCEVA™), інгібітори фактора росту отримані з тромбоцитів (наприклад, GLEEVEC™ (імаїніб мезилат)), інгібітор ЦОГ-2 (наприклад, целекоксиб), інтерферони, цитокіни, антагоністи (наприклад, нейтралізуючі антитіла), які зв'язуються з однією або більше з таких цілей ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-бета, BlyS, APRIL, BCMA або VEGF, TRAIL/Apo2 і інші біологічно активні та органічні хімічні речовини тощо. Їх комбінації також включені в винахід.

Використовуваний в цьому документі термін "цитотоксичний агент" відноситься до речовини, яка інгібує або запобігає клітинній функції і/або викликає загибель або руйнування клітин. Цитотоксичні агенти включають, але не обмежуються ними, радіоактивні ізотопи (наприклад, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² і радіоактивні ізотопи Lu); хіміотерапевтичні агенти або лікарські засоби (наприклад, метотрексат, адриаміцин, алкалоїди барвінку (вінкристин, вінбластин, етопозид), доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин С, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші інтеркалюючі агенти); інгібуючі зростання агенти; ферменти і їх фрагменти, такі як нуклеолітичні ферменти; антибіотики; токсини, такі як малі молекулярні токсини або ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, включаючи фрагменти і/або їх варіанти; і різні протипухлинні або протиракові агенти, описані нижче.

"Хіміотерапевтичний агент" являє собою хімічну сполуку, корисне для лікування раку. Приклади хіміотерапевтичних агентів включають хімічні сполуки, корисні для лікування раку. Приклади хіміотерапевтичних агентів включають алкілюючі агенти, такі як тіотепа і циклофосфамід CYTOXAN®; алкілсульфонати, такі як бусульфат, імпросульфат і піпосульфат; азиридин, такі як бензодоба, карбохінон, метуредоба і уредоба; етиленіміни і метиламеламіни, включаючи альтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметилломеламін; ацетогеніни (особливо буллатацин і буллатацінон); камптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекана); бріостатин; каллістатин; CC-1065 (включаючи синтетичні аналоги адозелезину, карцелезину і бізелезину); криптофіцини (зокрема, криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги, KW-2189 і CB1-TM1); елейтеробін; панкратистатин; саркодіктин; спонгістатин; азотисті іприти, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, гідрохлорид мехлоретамін оксиду, мелфалан, новембіцин, фенестерин, преднімусин, трофосфамід, урациловий іприт; нітрозосечовини, такі як кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімустин; антибіотики, такі як ендінові антибіотики (наприклад, каліхеаміцин, особливо каліхеаміцин гамма1 і каліхеаміцин омега1 (див., наприклад, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); дінеміцин, включаючи дінеміцин А; бісфосфонати, такі як хлордронат; еспераміцин; а також хромофор неокарзиностатина і пов'язані хромофори хромопротеїнів ендінових антибіотиків), аклаціномізини, актиноміцин, автраміцин, азасерин, блеоміцини, кактіноміцини, карабіцин, карміноміцин, карзинофілін, хромоміцини, дактіноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, ADRIAMYCIN® доксорубіцин (включаючи морфоліно-доксорубіцин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, 2-пірроліно-доксорубіцин і деоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцелломіцин, мітоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенольна кислота, ногаламіцин, олівоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, келаміцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидін, убенімекс, циностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуринові аналоги, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тиаміприн, тіогуанін; піримідинові аналоги, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азаурідін, кармофур, цитарабін, дідезоксіуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, пропіонат дромонастанола, епітіостанол, мепітіостан, тестолактон; антиадренали, такі як аміноглютетимід, мітотан, трилостан; замітник фолієвої кислоти, такої як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамідглікозид; амінолевулінова кислота; енілурацил; амсакрин; бестрабуцил; бізантрен; едатраксат; дефофамін; демеколцин; діазиквон; елфорнітин; еліптиній ацетат; епотилон; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовина; лентинан; лонідаїнін; майтансіноїди, такі як майтанін і ансамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітраєрин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантрон; подофіллінова кислота; 2-етилгідразид; прокарбазин; полісахаридний комплекс PSK® (JHS Natural Products, Юджин, Орегон); разоксан; різоксин; сизофіран; спірогерманій; тенуазонова кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлоротриетиламін; трихотецени (особливо токсин Т-2, верракурін А, роридин А і ангідін); уретан; віндезин; дакарбазин; манномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ара-С"); циклофосфамід; тіотепа; таксоноїди, наприклад, TAXOL® пакситаксел

(Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерсі), ABRAXANE™ без кремофора, альбумін-сконструйована композиція наночастинок з паклітакселу (American Pharmaceutical Partners, Шамберг, Іллінойс) і доксетаксель TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Ентоні, Франція); хлоранбуцил; GEMZAR® гемцитабін; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; платинові аналоги, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин; платини; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоксантрон; вінкристин; NAVELBINE® вінорелбін; новантрон; теніпозид; едатрексат; дауноміцин; аміноптерин; кселода; ібандронат; іринотекан (Camptosar, CPT-11) (включаючи режим лікування іринотеканом з 5-FU і лейковорином); інгібітор топоізомерази RFS 2000; діфформетилорнітин (DMFO); ретиноїди, такі як ретиноева кислота; капецитабін; комбретастатин; лейковорин (LV); оксалиплатин, включаючи режим лікування оксалиплатином (FOLFOX); інгібітори РК-альфа, Raf, H-Ras, EGFR (наприклад, ерлотиніб (TARCEVA™)) і VEGF-A, які зменшують проліферацію клітин і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якого з вищевказаних.

Також в це визначення включені антигормональні агенти, які діють, щоб регулювати або пригнічувати гормональну дію на пухлини, такі як антиестрогени і селективні модулятори рецепторів естрогенів (SERM), включаючи, наприклад, тамоксифен (включаючи тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, тріоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і FARESTON® тореміфен; інгібітори ароматази, які інгібують ферментативну ароматазу, яка регулює вироблення естрогену в надниркових залозах, такі як, наприклад, 4(5)-імідазоли, аміноглютетимід, мегестрола ацетат MEGASE®, екземелан AROMASIN®, форместан, фадрозол, RIVISOR® ворозол, FEMARA® летрозол і анастигол ARIMIDEX®; і антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, лейпролід і гoserelin; а також трокацитабін (аналог 1,3-діоксолан нуклеозидного цитозину); антисмислові олігонуклеотиди, особливо ті, які інгібують експресію генів в сигнальних шляхах, залучених в адренерну проліферацію клітин, такі як, наприклад, РК-альфа, Raf і H-Ras; рибозими, такі як інгібітор експресії VEGF (наприклад, рибозим ANGIOZYME®) і інгібітор експресії HER2; вакцини, такі як вакцини генної терапії, наприклад, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® і вакцина VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® інгібітор топоізомерази 1; ABARELIX® mRH; Вінорелбін і еспераміцини (див. пат. США № 4675187) і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якого з вищевказаних.

Використовуваний в цьому документі термін "проліки" відноситься до попередника або похідної форми фармацевтично активної речовини, яке менш цитотоксично до пухлинних клітин в порівнянні з вихідним лікарським засобом і може бути ферментативно активовано або перетворено в більш активну батьківську форму. Див., наприклад, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Проліки цього винаходу включають, але не обмежуються ними, проліки, що містять фосфат, проліки, що містять тіофосфат, проліки, що містять сульфат, проліки, що містять пептид, проліки, модифіковані D-амінокислотою, глікозильовані проліки, проліки, що містять β-лактам, необов'язково заміщені проліки, що містять феноксіацетамід, або необов'язково заміщені проліки, що містять фенілацетамід, 5-фторцитозин і інші 5-фторуридинові проліки, які можуть бути перетворені в більш активний цитотоксичний вільний лікарський засіб. Приклади цитотоксичних ліків, які можуть бути дериватизовані в пролікарську форму для використання в цьому винаході, включають, але не обмежуються ними, хіміотерапевтичні агенти, описані вище.

Термін "листок-вкладиш" використовується для позначення інструкцій, зазвичай включаються в комерційні пакети терапевтичних продуктів, які містять інформацію про показання, використання, дозування, введення, комбінованої терапії, протипоказання і/або попередження щодо використання таких терапевтичних продуктів.

"Фармацевтично прийнятний носій" відноситься до інгредієнту у фармацевтичній композиції, яка відмінна від активного інгредієнта, яка нетоксична для суб'єкта. Фармацевтично прийнятний носій включає, але не обмежується ними, буфер, ексципієнт, стабілізатор або консервант.

Термін "фармацевтичний склад" відноситься до препарату, який знаходиться в такій формі, щоб забезпечити біологічну активність активного інгредієнта (наприклад, антитіла проти VEGF, кон'югату антитіла, злитого білка або полімерної композиції), що міститься в ньому, для ефективності, і який не містить додаткових компонентів, які є неприйнятно токсичні для суб'єкта, якому буде вводитися препарат.

Використовуваний в цьому документі, термін "лікування" (і його граматичні варіації, такі як "лікувати" або "лікування") відноситься до клінічного втручання в спробі змінити природний хід лікування індивідуума, і може бути виконано або для профілактики, або під час ходу клінічної

патології. Бажані ефекти лікування включають, але не обмежуються ними, запобігання виникненню або рецидиву захворювання, полегшення симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, запобігання метастазів, зниження швидкості прогресування захворювання, поліпшення або ослаблення стану хвороби, ремісія або покращення прогнозу. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіла винаходу або інші композиції, які включають антитіло даного винаходу (наприклад, кон'югат антитіла, злитий білок або полімерну композицію), використовуються для уповільнення розвитку захворювання або уповільнення прогресування захворювання.

"Ізольована" молекула нуклеїнової кислоти являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, яка ідентифікована і відділена від щонайменше однієї молекули нуклеїнової кислоти-забруднювача, з якою вона зазвичай асоціюється в природному джерелі нуклеїнової кислоти. Ізольована молекула нуклеїнової кислоти відрізняється від форми або конфігурації, в якій вона зустрічається в природі. Таким чином, ізольовані молекули нуклеїнових кислот відрізняються від молекули нуклеїнової кислоти, який вона існує в природних клітинах. Однак ізольована молекула нуклеїнової кислоти включає молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які зазвичай експресують антитіло, де, наприклад, молекула нуклеїнової кислоти знаходиться в хромосомному положенні, відмінному від положення в природних клітинах.

Вираз "контролюючи послідовності" відноситься до послідовностей ДНК, необхідним для експресії функціонально пов'язаної послідовності, що кодує в конкретному організмі-хазяїні. Контрольні послідовності, які підходять для прокаріотів, наприклад, включають промотор, необов'язково послідовність оператора і сайт зв'язування рибосом. Відомо, що в еукаріотичних клітинах застосовуються промотори, сигнали поліаденілювання і енхансери.

Нуклеїнова кислота є "функціонально пов'язаною", якщо вона вступає в функціональне взаємовідношення з іншою послідовністю нуклеїнової кислоти. Наприклад, ДНК передпослідовності або секреторного лідера є функціонально пов'язаною з ДНК поліпептиду, якщо вона експресується як пребілок, який бере участь в секреції цього поліпептиду; промотор або енхансер функціонально пов'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію цієї послідовності, або ділянка зв'язування рибосом функціонально пов'язана з кодуючою послідовністю, якщо вона розташована так, щоб оптимізувати процес трансляції. В цілому, "функціонально пов'язаний" означає, що послідовності ДНК, будучи пов'язаними, є безперервними і, в разі наявності секреторного лідера, безперервними і в фазі зчитування. Проте, енхансери не повинні бути безперервними. Зв'язування супроводжується лігуванням по відповідним ділянкам рестрикції. Якщо таких сайтів не існує, синтетичні олігонуклеотидні адаптери або лінкери використовуються відповідно до звичайної практики.

Як використовується в цьому документі, вирази "клітина", "клітинна лінія" і "культура клітин" використовуються як взаємозамінні, і всі такі позначення включають потомство. Таким чином, слова "трансформанти" і "трансформовані клітини" включають в себе первинну клітину індивіда і культури, отримані з неї, без урахування кількості пасажів. Також зрозуміло, що все потомство не може бути точно ідентичним за змістом ДНК через навмисні або ненавмисні мутації. Мутантні потомства, які володіють тією ж функцією або біологічною активністю, що і скриновані в спочатку трансформованій клітині. Там, де призначені різні позначення, це буде зрозуміло з контексту.

Використовуваний в цьому документі термін "бібліотека" відноситься до безлічі антитіл або послідовностей фрагментів антитіла (наприклад, антитіл проти VEGF по винаходу) або нуклеїнових кислот, які кодують ці послідовності, причому послідовності відрізняються одна від одної в комбінації варіантів амінокислот, які вводять в ці послідовності відповідно до способів цього винаходу.

"Мутація" являє собою делецію, вставку або заміщення нуклеотиду(ів) відносно встановленої еталонної нуклеотидної послідовності, такий як послідовність дикого типу.

Використовуваний в цьому документі термін "набір кодонів" відноситься до набору різних нуклеотидних триплетних послідовностей, використовуваних для кодування бажаних варіантів амінокислот. Набір олігонуклеотидів може бути синтезовано, наприклад, шляхом твердофазного синтезу, включаючи послідовності, які представляють всі можливі комбінації нуклеотидних триплетів, що надаються набором кодонів, і які будуть кодувати бажану групу амінокислот. Стандартна форма позначення кодонів відноситься до коду IUB, відомому в цій галузі техніки і описаного в цьому документі. Зазвичай набір кодонів позначений курсивом за допомогою 3х заголовних літер, наприклад, NNK, NNS, XYZ, DVK і т. п. Синтез олігонуклеотидів з обраним нуклеотидним "виродженням" в певних положеннях добре відомий в цій галузі техніки, наприклад, підхід TRIM (Knapp et al., J. Mol. Biol. 296:57-86 (1999)); Garrard et al., Gene 128:103(1993)). Такі набори олігонуклеотидів, що мають певні набори кодонів, можуть бути

синтезовані з використанням комерційних синтезаторів нуклеїнових кислот (доступні, наприклад, від Applied Biosystems, Фостер Сіті, Каліфорнія), або можуть бути отримані комерційно (наприклад, з Life Technologies, Роквілль, Меріленд). Отже, набір олігонуклеотидів, синтезованих з конкретним набором кодонів, зазвичай включає в себе безліч олігонуклеотидів з різними послідовностями, відмінності, встановлені набором кодонів в загальній послідовності. Олігонуклеотиди, використовувані відповідно до винаходу, мають послідовності, які допускають гібридизацію з зразком нуклеїнової кислоти з варіабельною ділянкою, а також можуть, але необов'язково, включати сайти рестрикційних ферментів, придатні, наприклад, для цілей клонування.

"Фаговий дисплей" являє собою спосіб, при якому варіантні поліпептиди відображаються у вигляді злитих білків щонайменше на частині білкової оболонки на поверхні фага, наприклад, ниткоподібний фаг, частки. Утиліта фагового дисплея полягає в тому, що великі бібліотеки рандомізованих варіантів білка можуть швидко і ефективно сортуватися для тих послідовностей, які зв'язуються з цільовим антигеном з високою спорідненістю. Відображення бібліотек пептидів і білків на фагові було використано для скринінгу мільйонів поліпептидів для тих, які мають специфічні зв'язуючі властивості. Полівалентні способи фагового дисплея використовувалися для відображення малих випадкових пептидів і малих білків через злиття або з геном III, або з геном VIII ниткоподібного фага. Wells and Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol., 3: 355-362 (1992) і посилання, цитовані в ньому. У моновалентному фаговому дисплеї бібліотека білка або пептиду злита з геном III або його частиною і експресується на низьких рівнях в присутності білка гена III дикого типу, так що частки фага відображають одну копію або жоден зі злитих білків. Ефекти авідності знижуються в порівнянні з полівалентним фагом, тому сортування засновано на афінності власного ліганда, і використовуються вектори фагемідів, які спрощують маніпуляції з ДНК. Lowman and Wells, Methods: A companion to Methods in Enzymology, 3:205-0216 (1991).

"Фагемід" являє собою плазмідний вектор, який має бактеріальне походження реплікації, наприклад, Co1E1, і копію міжгенної ділянки бактеріофага. Фагемід можна використовувати на будь-якому відомому бактеріофагу, включаючи філаментний бактеріофаг і лямбдоїдний бактеріофаг. Плазміда також зазвичай буде містити селективний маркер стійкості до антибіотиків. Сегменти ДНК, клоновані в ці вектори, можуть поширюватися у вигляді плазмід. Коли клітини, що вкривають ці вектори, забезпечуються всіма генами, необхідними для виробництва фагових часток, спосіб реплікації плазміди змінюється на реплікацію за типом "кільця, що котиться", щоб генерувати копії одного ланцюга плазмідної ДНК і оболонки фагів часток. Фагемід може утворювати інфекційні або неінфекційні частки фага. Цей термін включає в себе фагеміди, які містять ген білка оболонки фага або його фрагмент, пов'язаний з гетерологічним геном поліпептиду в якості гена злиття, так що гетерологічний поліпептид відображається на поверхні фагової частки.

Термін "вектор фага" означає дволанцюгову реплікативну форму бактеріофага, що містить гетерологічний ген і здатний до реплікації. Вектор фага має фагове походження реплікації, що забезпечує реплікацію фага і утворення фагових часток. Фагом переважно є ниткоподібний бактеріофаг, такий як фаг M13, f1, fd, Pf3 або його похідне, або лямбдоподібний фаг, такий як лямбда, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434 і т. д., або його похідне.

"Варіант" або "мутант" вихідного або еталонного поліпептиду (наприклад, еталонного антитіла або його варіабельного домену(ів)/HVR) являє собою поліпептид, який (1) має амінокислотну послідовність, відмінну від амінокислотної послідовності вихідного або еталонного поліпептиду і (2) був отриманий з вихідного або еталонного поліпептиду за допомогою природного або штучного (створеного людиною) мутагенезу. Такі варіанти включають, наприклад, делеції з, і/або вставки в, і/або заміни залишків в амінокислотній послідовності поліпептиду, який становить інтерес, позначені в цьому документі як "зміни амінокислотних залишків". Таким чином, варіант HVR відноситься до HVR, який містить варіантну послідовність щодо вихідної або еталонної поліпептидної послідовності (такі як вихідне антитіло або антигензв'язуючий фрагмент). У цьому контексті зміна амінокислотного залишку відноситься до амінокислоти, відмінної від амінокислоти у відповідному положенні у вихідній або еталонній поліпептидній послідовності (таке як еталонне антитіло або його фрагмент). Будь-яка комбінація делеції, вставки і заміни може бути виконана для отримання остаточного варіанту або конструкції мутантів за умови, що кінцева конструкція має бажані функціональні характеристики. Амінокислотні зміни також можуть змінювати посттрансляційні процеси поліпептиду, такі як зміна кількості або положення сайтів глікозилювання.

Послідовність "дикого типу (ДТ)" або "еталонна" послідовність або послідовність "дикого типу" або "еталонного" білка/поліпептиду, такого як HVR або варіабельний домен еталонного

антитіла, може бути контрольною послідовністю з якої варіантні поліпептиди отримують шляхом введення мутацій. Загалом, послідовність "дикого типу" для цього білка є послідовність, яка найбільш поширена в природі. Аналогічно, послідовність гена "дикого типу" являє собою послідовність цього гена, яка найбільш часто зустрічається в природі. Мутації можуть бути

5 введені в ген "дикого типу" (і, отже, білок, який він кодує), або за допомогою природних процесів, або за допомогою штучних способів. Продукти таких процесів є "варіантними" або "мутантними" формами вихідного білка або гена "дикого типу".

"Еталонне антитіло", як використовується в цьому документі, відноситься до антитіла або фрагмента, чия антигензв'язуюча послідовність слугує в якості шаблонів послідовності, на якій

10 виконується диверсифікація відповідно до описаних в цьому документі критеріїв. Антигензв'язуюча послідовність зазвичай включає варіабельну ділянку антитіла, переважно щонайменше один HVR, переважно включає каркасні області.

Під "масовим паралельним сіквенуванням" або "масивним паралельним сіквенуванням", також відомим в цій галузі техніки як "сіквенування наступного покоління" або "сіквенування другого

15 покоління", мається на увазі будь-який підхід з високим ступенем пропускну здатності нуклеїнової кислоти. Ці підходи зазвичай включають паралельне сіквенування великої кількості (наприклад, тисяч, мільйонів або мільярдів) просторово розділених, ампліфікованих клонуванням зразків ДНК або одиночних молекул ДНК. Див., наприклад, Metzker, Nature Reviews Genetics 11: 31-36, 2010.

"Збагачений", як використовується в цьому документі, означає, що сутність (наприклад, зміна амінокислотного залишку) присутня в більш високій частоті в сортованій бібліотеці в порівнянні з відповідною еталонною бібліотекою (наприклад, несортованій бібліотеці або бібліотеці, яка була відсортована для іншого або антигену, що не застосовується). Навпаки, "виснажений" означає, що сутність (наприклад, зміна амінокислотного залишку) присутня в більш низькій частоті в сортованій бібліотеці в порівнянні з відповідною еталонною бібліотекою (наприклад, несортованій бібліотеці або бібліотеці, яка була відсортована для іншого або антигену, що не застосовується). Термін "нейтральний" при використанні щодо способів ідентифікації варіантів амінокислотних залишків означає, що сутність не збагачена і не виснажена, іншими словами, вона присутня приблизно на тій же частоті в сортованій бібліотеці в порівнянні з відповідною еталонною бібліотекою (наприклад, несортованою бібліотекою або бібліотекою, яка була відсортована для іншого або антигену, що не застосовується).

Під "ізоелектричною точкою (pI)" розуміють рН, при якому молекула (наприклад, білок, такий як антитіло) не несе ніякого електричного заряду, також відомий в цій галузі як "рН (I)" або "IEP". Використовуваний в цьому документі термін "кон'югат антитіла" являє собою антитіло, яке ковалентно приєднано до одного або більше полімерів. Будь-який відповідний полімер може бути кон'югований з антитілом, наприклад гідрофільним полімером (наприклад, гіалуроновою кислотою (HA) або поліетиленгліколем (ПЕГ)) або гідрофобним полімером (наприклад, полі(молочно-ко-гліколева кислота) (PLGA)).

Використовуваний в цьому документі термін "полімер" означає молекулу, яка включає повторювані структурні одиниці (тобто мономери), пов'язані хімічними зв'язками лінійним, круговим, розгалуженим, зшитим або дендримерним способом або їх комбінацією. Полімер може бути синтетичним або природним або їх комбінацією. Слід розуміти, що термін "полімер" охоплює сополімери, які являють собою полімери, які включають два або більше різних мономера. Полімер також може бути гомополімером, який являє собою полімер, який включає тільки мономер одного типу.

Терміни "гіалуронова кислота", "гіалуранон" і "HA", які використовуються в цьому документі як взаємозамінні, належать до полімерного глікозаміноглікану (GAG), який містить повторювані дисахаридні ланки N-ацетилглюкозаміна і глюкуронової кислоти. HA являє собою аніонний, несольфатований GAG, який можна знайти, наприклад, у позаклітинному матриксі (наприклад, в склоподібному тілі ока), сполучній тканині, епітеліальній і нервовій тканині.

Використовуваний в цьому документі термін "поліетиленгліколь" або "ПЕГ" відноситься до поліефірної сполуки, яка також відома як поліетиленоксид (ПЕО) або поліоксиетилен (ПОЕ) в залежності від його молекулярної маси. ПЕГ може мати структуру $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$, де n - будь-яке додатне ціле число. ПЕГ може являти собою розгалужений ПЕГ, зірчастий ПЕГ або гребінчастий ПЕГ. ПЕГ може бути, наприклад, тетрамером ПЕГ, гексамером ПЕГ або октамером ПЕГ.

Використовуваний в цьому документі термін "злитий білок" відноситься до білка, в якому перший пептид, білок або поліпептид, наприклад антитіло (наприклад, антитіло проти VEGF (наприклад, будь-який антитіло проти VEGF, описане в цьому документі, наприклад, G6.31 AARR)) безпосередньо або опосередковано пов'язується з другим пептидом, білком або

поліпептидом, наприклад, з окулярним зв'язуючим доменом (наприклад, з НА-зв'язуючим доменом). В одному прикладі перший пептид, білок або поліпептид (наприклад, антитіло) може бути пов'язаний з другим пептидом, білком або поліпептидом (наприклад, окулярним зв'язуючим доменом (наприклад, НА-зв'язуючим доменом)) за допомогою лінкера. В контексті злитих білків терміни "зв'язувати" і "зв'язані" і їх граматичні варіації взаємозамінні з терміном "ковалентно приєднані" і відносяться до прямого або непрямого ковалентного зв'язування (наприклад, пептидного зв'язку) між двома частинами злитого білка. Загалом, злиті білки цього винаходу являють собою злиті білки антитіл. Антитіло може являти собою фрагмент антитіла, наприклад Fab, Fab' або Fab-C. У деяких випадках фрагмент антитіла являє собою Fab.

Термін "окулярний зв'язуючий домен" відноситься до пептиду, білку, поліпептиду або їхньому фрагменту, який зв'язується з біологічною речовиною, що знаходиться в оці (наприклад, рогівкою, склоподібним тілом, сітківкою, сітчастим епітелієм сітківки або судинною оболонкою). В якості одного прикладу, в деяких випадках, біологічна речовина, виявлена в оці, являє собою позаклітинний матричний компонент, наприклад, вуглевод (наприклад, заряджений вуглевод (наприклад, глікозаміноглікан)), глікопротеїн (наприклад, фібрилін і оптіцин) або білок (наприклад, колаген (наприклад, колаген I-XXVII, зокрема колаген II, колаген IX, колаген V, колаген VI, колаген XI і гетеротипічні колагенові фібрили) або інші компоненти позаклітинного матриксу, описані, наприклад, в Le Goff et al., Eye 22: 1214-1222, 2008. У деяких випадках компонент позаклітинного матриксу являє собою глікозаміноглікан, наприклад НА або протеоглікан (наприклад, хондроїтинсульфат або сульфат гепарину). В одному прикладі окулярний зв'язуючий домен є зв'язуючим доменом гіалуронової кислоти.

Використовуваний в цьому документі термін "зв'язуючий домен гіалуронової кислоти" або "зв'язуючий домен НА" відноситься до пептиду, білку, поліпептиду або його фрагменту, який зв'язує НА. НА-зв'язуючий домен може бути отриманий з НА-зв'язуючого білка (який також згадується в цій галузі техніки як "гіаладерін"), включаючи, наприклад, ген 6 стимульованого фактора некрозу пухлин (TSG6), ендотеліальний гіалуронановий рецептор лімфатичних судин 1 (LYVE-1), гіалуронановий і протеоглікановий зв'язуючий білок (HAPLN) 1, HAPLN2, HAPLN3, HAPLN4, агрекан, бревікан, нейрокан, фосфакан, версікан, CAB61358, KIA0527, стабілін-1, стабілін-2, RHAMM, бактеріальну НА-синтазу і колаген VI. Інші НА-зв'язуючі білки відомі в цій області. Типові НА-зв'язуючі домени включають в себе зв'язуючі модулі, домени G1 і олігопептиди, багаті на лізин.

"Модуль зв'язку" (який також згадується в цій галузі як "домен зв'язку") є структурним доменом, що містить приблизно 100 амінокислот (див., наприклад, Yang et al., EMBO J., 13 (2): 286-296; Mahoney et al., J. Biol. Chem. 276(25): 22764-22771, 2001; і Blundell et al. J. Biol. Chem. 278 (49): 49261-49270, 2003), який зв'язує НА. Типові, не обмежуючі модулі зв'язування включають ті, з TSG6, CD44, LYVE-1, HAPLN1, HAPLN2, HAPLN3, HAPLN4, агрекана, бревікана, нейрокана, фосфакана, версікана, CAB61358, KIA0527, стабіліна-1 і стабіліна-2 модулів зв'язування, або їх варіанти. В якості одного з прикладів, модуль зв'язування НА-зв'язуючого білка TSG6 може включати амінокислотні залишки 36-128 TSG6 людини (UniProt № доступу P98066). Варіант модуля зв'язку пов'язує НА і може мати, наприклад, ідентичність щонайменше 80 % амінокислотної послідовності (наприклад, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або вищою ідентичністю) до модуля зв'язку дикого типу або еталона, і може включати в себе варіації послідовності, такі як вставки, делеції і заміни (наприклад, консервативні амінокислотні заміни) щодо модуля зв'язування дикого типу або еталона амінокислотної послідовності.

В контексті злитих білків, "лінкер" може бути пептидом або поліпептидом, який пов'язує (наприклад, ковалентно зв'язує) перший фрагмент (наприклад, антитіло (наприклад, антитіло проти VEGF (наприклад, будь-яке антитіло проти VEGF, описане в цьому документі, наприклад, G6.31 AARR))) з другим фрагментом (наприклад, окулярним зв'язуючим доменом (наприклад, НА-зв'язуючим доменом)). Лінкер може включати амінокислотну послідовність будь-якої зручної довжини, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або більше амінокислотних залишків. У деяких випадках лінкер включає близько 3, близько 4, близько 5, близько 6, близько 7 або близько 8 залишків. У деяких випадках лінкер включає амінокислотну послідовність GGGGS (SEQ ID NO: 61).

Використовуваний в цьому документі термін "гідрогель" відноситься до гідрофільної або амфіфільної полімерної мережі, що складається з гомополімерів або співполімерів, яка нерозчинна через наявність ковалентних хімічних зшивок. Зшивання можуть забезпечувати структуру мережі і фізичну цілісність. Гідрогелі можуть демонструвати термодинамічну сумісність з водою, що дозволяє їм набухати у водних середовищах.

Використовуваний в цьому документі термін "оборотний пролікарський лінкер" означає фрагмент, який приєднаний одним кінцем до біологічно активного фрагмента (наприклад, лікарського засобу, такого як антитіло проти VEGF) через оборотний зв'язок і прикріплений іншим кінцем через постійний зв'язок з носієм (наприклад, гідрогелем), тим самим пов'язуючи біологічно активний фрагмент з носієм. Такі оборотні пролікарські лінкери є такими, що неферментативно гідролізуються, тобто розщеплюється в фізіологічних умовах (наприклад, водним буфером при pH 7,4, 37 °C) з періодом напіврозпаду від, наприклад, однієї години до дванадцяти місяців. Оборотні зв'язки включають, наприклад, акотили, ацетали, амідни, ангідриди карбонових кислот, складні ефіри, іміни, гідрозони, амідни малеїновий кислоти, ортоестери, фосфамідни, фосфоефіри, складні ефіри фосфосиліла, силілові ефіри, сульфонові ефіри, ароматичні карбамати і їх комбінації. Навпаки, постійні зв'язки є такими, що неферментативно гідролітично розкладаються в фізіологічних умовах (водний буфер при pH 7,4, 37 °C) з періодом напіврозпаду більше дванадцяти місяців. Типові оборотні пролікарські лінкери описані, наприклад, в публікації міжнародної патентної заявки № WO 2014/056923, яка повністю включена в цей опис за допомогою посилання.

Використовуваний в цьому документі термін "кліренс" відноситься до об'єму речовини (наприклад, антитіла проти VEGF, кон'югату антитіла, злитому білку (наприклад, злитому білку Fab) або полімерного складу), який видаляється з компартмента (наприклад, очі (наприклад, склоподібного тіла)) в одиницю часу.

Термін "період напіввиведення" відноситься до часу, необхідного для поділу концентрації речовини (наприклад, антитіла проти VEGF, кон'югата антитіла, злитого білка (наприклад, злитого білка Fab) або полімерної композиції), на половину, *in vivo* (наприклад, в оці (наприклад, склоподібному тілі)) або *in vitro*.

II. КОМПОЗИЦІЇ І СПОСОБИ

Винахід відноситься до нових антитіл, які зв'язуються з VEGF, і до способів отримання і їх використання, наприклад, для діагностичних і терапевтичних цілей. Винахід також відноситься до композицій, які включають антитіла проти VEGF (включаючи будь-яке антитіло проти VEGF, описане в цьому документі), включаючи кон'югати антитіл, злиті білки і полімерні складу, а також способи їх отримання і їх використання, наприклад, для діагностики та терапевтичного використання. Винахід також відноситься до способів ідентифікації варіантів антитіл з покращеними властивостями, наприклад, з підвищеною афінністю зв'язування, стабільністю і/або експресією.

A. Ілюстративні антитіла проти VEGF

В одному аспекті, винахід засновано, зокрема, на антитілах, які специфічно зв'язуються з VEGF. Антитіла цього винаходу корисні, наприклад, для зменшення ангіогенезу і для лікування або уповільнення прогресування розладу, пов'язаного з патологічним ангіогенезом (наприклад, окулярними розладами або клітинними проліферативними порушеннями). Антитіла цього винаходу також корисні, наприклад, для інгібування проникності судин і лікування розладів, пов'язаних з небажаною проникністю судин.

У деяких випадках антитіло проти VEGF може включати щонайменше один, два, три, чотири, п'ять або шість HVR, обраних з: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GX₁TPX₂GGX₃ × X₄YX₆DSVX₇ × X₈ (SEQ ID NO: 2), де X₁ являє собою Ile або His, X₂ являє собою Ala або Arg, X₃ являє собою Tyr або Lys, X₄ являє собою Thr або Glu, X₅ являє собою Arg, Tyr, Gln або Glu, X₆ являє собою Ala або Glu, X₇ являє собою Lys або Glu, а X₈ являє собою Gly або Glu; (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQX₁VSTAVA (SEQ ID NO: 4), де X₁ являє собою Asp або Arg; (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність X₁ASFLYS (SEQ ID NO: 5), де X₁ являє собою Ser або Met; і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність X₁QGYGX₂PFT (SEQ ID NO: 6), де X₁ являє собою Gln, Asn або Thr і X₂ являє собою Ala, Asn, Gln або Arg або комбінацію одного або більше з вищевказаних HVR і одного або більше його варіантів, що мають щонайменше близько 80 % ідентичності послідовності (наприклад, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності) будь-якої з SEQ ID NO: 1-6.

Наприклад, антитіло проти VEGF може включати щонайменше один, два, три, чотири, п'ять або шість HVR, обраних з: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7), GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 21) або GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить

амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10) або QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23), або комбінацію одного або більше з вищевказаних HVR і одного або більше його варіантів, що мають щонайменше близько 80 % ідентичності послідовності (наприклад, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності) будь-якої з SEQ ID NO: 1, 3, 7-10 або 21-23.

Наприклад, у деяких випадках антитіло проти VEGF може включати щонайменше один, два, три, чотири, п'ять або шість HVR, обраних з: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10), або комбінацію одного або більше з вищевказаних HVR і одного або більше його варіантів, що мають щонайменше близько 80 % ідентичності послідовності (наприклад, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності) до будь-якої з SEQ ID NO: 1, 3 або 7-10. У конкретному прикладі в деяких випадках антитіло проти VEGF містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10).

У деяких випадках будь-яка з попередніх анти-VEGF антитіл може включати один, два, три або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену важкого ланцюга (FR): (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 16).

У деяких випадках будь-яка з попередніх анти-VEGF антитіл може включати один, два, три або чотири з наступних FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

Наприклад, в деяких випадках антитіло проти VEGF містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких випадках анти-VEGF антитіло включає в себе наступні чотири FR варіабельного домену важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 16).

В інших випадках анти-VEGF антитіло включає наступні чотири FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких випадках антитіло проти VEGF включає (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

Наприклад, у деяких випадках антитіло проти VEGF може включати щонайменше один, два, три, чотири, п'ять або шість HVR, обраних з: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність

GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23), або комбінацію одного або більше з вищевказаних HVR і одного або більше його варіантів, що мають щонайменше близько 80 % ідентичності послідовності (наприклад, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності) до будь-якої з SEQ ID NO: 1, 3, 8, 9, 22 або 23. У конкретному прикладі в деяких випадках антитіло проти VEGF містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23).

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-VEGF антитіл може включати один, два, три або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену важкого ланцюга (FR): (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) або EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 51); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELTVSS (SEQ ID NO: 32).

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-VEGF антитіл може включати один, два, три або чотири з наступних FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

Наприклад, в деяких випадках антитіло проти VEGF містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23). У деяких випадках анти-VEGF антитіло включає в себе наступні чотири FR варіабельного домену важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELTVSS (SEQ ID NO: 32).

В інших випадках анти-VEGF антитіло включає наступні чотири FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких випадках антитіло проти VEGF включає (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38.

В деяких випадках антитіло проти VEGF містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23). У деяких випадках анти-VEGF антитіло включає в себе наступні чотири FR варіабельного домену важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 51); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELTVSS (SEQ ID NO: 32). В інших

випадках анти-VEGF антитіло включає наступні чотири FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність

5 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких випадках антитіло проти VEGF включає (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38.

Наприклад, у деяких випадках антитіло проти VEGF може включати щонайменше один, два, три, чотири, п'ять або шість HVR, обраних з: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10), або комбінацію одного або більше з вищевказаних HVR і одного або більше його варіантів, що мають щонайменше близько 80 % ідентичності послідовності (наприклад, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності) до будь-якої з SEQ ID NO: 1, 3, 8-10 або 22. У конкретному прикладі в деяких

10 випадках антитіло проти VEGF містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10).

15

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-VEGF антитіл може включати один, два, три або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену важкого ланцюга (FR): (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) або EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 51); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32).

У деяких випадках будь-яка з попередніх анти-VEGF антитіл може включати один, два, три або чотири з наступних FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 17), DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 25) або DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 26); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18) або WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність

30 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19) або GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

Наприклад, в деяких випадках антитіло проти VEGF містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких випадках анти-VEGF антитіло включає в

себе наступні чотири FR варіабельного домену важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32).

В інших випадках анти-VEGF антитіло включає наступні чотири FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 25); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що

50

55

60

проти VEGF включає (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

В інших випадках антитіло проти VEGF містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVESG (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQQYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких випадках анти-VEGF антитіло включає в себе наступні чотири FR варіабельного домену важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLRSLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 51); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 32). В інших випадках анти-VEGF антитіло включає наступні чотири FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких випадках антитіло проти VEGF включає (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

У деяких випадках, анти-VEGF антитіло містить (а) варіабельний домен важкого ланцюга (VH), що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовності) або будь-якій з послідовності SEQ ID NO: 11, 40 або 42; (b) варіабельний домен легкого ланцюга (VL), що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90 % послідовність (наприклад, щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовності) або будь-який з послідовності SEQ ID NO: 12, 41 або 46; або (c) домен VH, як в (а), і домен VL, як в (b). Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46.

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-VEGF антитіл може включати один, два, три або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену важкого ланцюга (FR): (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14) або WVRQEPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 39); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 16).

У деяких випадках будь-яка з попередніх анти-VEGF антитіл може включати один, два, три або чотири з наступних FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17) або DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIDC (SEQ ID NO: 45); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSATYYC (SEQ ID NO: 44) або GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC (SEQ ID NO: 54); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20) або FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 55). Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQQYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

5 Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

10 Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

15 Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

20 Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

25 Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

30 Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

35 Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

Наприклад, в деяких випадках антитіло проти VEGF містить (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовності) або послідовності SEQ

40 ID NO: 11; (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовності) або послідовності SEQ ID NO: 11; або (c) домен VH, як в (а), і домен VL, як в (b). У деяких випадках антитіло проти VEGF може включати (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить

45 амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких випадках антитіло проти VEGF включає

50 наступні каркасні ділянки важкого ланцюга: (а) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16). У деяких

55 випадках анти-VEGF антитіло включає наступні каркасні ділянки легкого ланцюга: (а) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких

60 випадках антитіло проти VEGF включає зв'язуючий домен, що містить (а) домен VH, що містить

амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. У деяких випадках ілюстративний анти-VEGF являє собою N94A.F83A.N82aR.Y58R.

В деяких випадках антитіло проти VEGF містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовності) або послідовності SEQ ID NO: 33 або 51; (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90 % послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовності) або послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 12, 34, 35, 36, 37 або 38; або (c) домен VH, як в (a), і домен VL, як в (b). Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37. Наприклад, в деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51 і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-VEGF антитіл може включати один, два, три або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену важкого ланцюга (FR): FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) або EEQLVEEGGGLVQPGESLRSLAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLWVA (SEQ ID NO: 30) або WVRQEPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 39); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 32).

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-VEGF антитіл може включати один, два, три або чотири з наступних FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 25) або DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 26); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18) або WYQQKPGEAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24) або GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

У деяких випадках винахід забезпечує антитіло, що містить (a) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48 і/або (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло являє собою G6.31 AARR, яке експресоване в форматі Fab.

У деяких випадках винахід забезпечує антитіло, що містить (a) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49 і/або (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло являє собою варіант версії G6.31 AARR, яка не володіє реакційною здатністю до анти-людському IgG.

У наступному аспекті анти-VEGF антитіло відповідно до будь-якого з вищенаведених варіантів здійснення винаходу може включати будь-яку з ознак, окремо або в комбінації, як описано в розділах 1-8 нижче:

1. Афінність антитіл

У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло, представлене в даному документі, має константу дисоціації (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад від 10^{-9} М до 10^{-13} М). Наприклад, в деяких випадках антитіло, представлене в цьому документі, зв'язує VEGF людини (hVEGF) з K_d близько 10 нМ або нижче. У деяких випадках антитіло, представлене в цьому документі, зв'язує hVEGF з K_d близько 5 нМ або нижче. У деяких випадках антитіло, представлене в цьому документі, зв'язує hVEGF з K_d між близько 25 пМ і близько 2 нМ (наприклад, близько 25 пМ, близько 50 пМ, близько 75 пМ, близько 100 пМ, близько 125 пМ, близько 150 пМ, близько 175 пМ, близько 200 пМ, близько 225 пМ, близько 250 пМ, близько 275 пМ, близько 300 пМ, близько 325 пМ, близько 350 пМ, близько 375 пМ, близько 400 пМ, близько 425 пМ, близько 450 пМ, близько 475 пМ, близько 500 пМ, близько 525 пМ, близько 550 пМ, близько 575 пМ, близько 600 пМ, близько 625 пМ, близько 650 пМ, близько 675 пМ, близько 700 пМ, близько 725 пМ, близько 750 пМ, близько 775 пМ, близько 800 пМ, близько 825 пМ, близько 850 пМ, близько 875 пМ, близько 900 пМ, близько 925 пМ, близько 950 пМ, близько 975 пМ, близько 1 нМ, близько 1,1 нМ, близько 1,2 нМ, близько 1,3 нМ, близько 1,4 нМ, близько 1,5 нМ, близько 1,6 нМ, близько 1,7 нМ, близько 1,8 нМ, близько 1,9 нМ або близько 2 нМ). У деяких випадках антитіло зв'язує hVEGF з K_d між близько 75 пМ і близько 600 пМ (наприклад, близько 75 пМ, близько 100 пМ, близько 125 пМ, близько 150 пМ, близько 175 пМ, близько 200 пМ, близько 225 пМ, близько 250 пМ, близько 275 пМ, близько 300 пМ, близько 325 пМ, близько 350 пМ, близько 375 пМ, близько 400 пМ, близько 425 пМ, близько 450 пМ, близько 475 пМ, близько 500 пМ, близько 525 пМ, близько 550 пМ, близько 575 пМ, близько 600 пМ). У деяких випадках антитіло зв'язує hVEGF з K_d між близько 75 пМ і близько 500 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує hVEGF з K_d між близько 75 пМ і близько 400 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує hVEGF з K_d між близько 75 пМ і близько 300 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує hVEGF з K_d між близько 75 пМ і близько 200 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує hVEGF з K_d між близько 75 пМ і близько 150 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує hVEGF з K_d між близько 75 пМ і близько 100 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує hVEGF з K_d близько 80 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує hVEGF з K_d близько 60 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує hVEGF з K_d близько 40 пМ.

В одному варіанті здійснення винаходу, K_d вимірюється за допомогою радіоактивно міченого антигензв'язуючого аналізу (RIA). В одному варіанті здійснення винаходу, RIA виконують з Fab-версією антитіла, яке цікавить, і його антигену. Наприклад, афінність зв'язування розчину Fab для антигену вимірюється шляхом врівноваження Fab з мінімальною концентрацією (125 I)-міченого антигену в присутності титрованої серії неміченого антигену, а потім захоплення зв'язаного антигену чашкою, покритої анти-Fab антигеном (див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Щоб встановити умови для аналізу, багаторазові планшети MICROTITER® (Thermo Scientific) покривають протягом ночі 5 мкг/мл вловлюючим антитілом проти Fab (Cappel Labs) в 50 мМ карбонату натрію (pH 9,6) і потім блокують 2 % (маса/об'єм) бичачого сироваткового альбуміну (BSA) в натрій-фосфатному буфері (PBS) протягом двох-п'яти годин при кімнатній температурі (приблизно 23 °C). В неадсорбуючому планшеті (Nunc # 269620), 100 пМ або 26 пМ [125 I]-антиген змішують з серійними розведеннями Fab, що представляють інтерес (наприклад, відповідно до оцінки антитіла проти VEGF, Fab-12, в Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)). Потім Fab, що представляє інтерес, інкубують протягом ночі; однак інкубація може тривати протягом більш тривалого періоду (наприклад, близько 65 годин), щоб забезпечити досягнення рівноваги. Після цього суміші переносяться на захоплюючому планшеті для інкубації при кімнатній температурі (наприклад, протягом однієї години). Потім розчин видаляють, і планшет промивають вісім разів 0,1 % Полісорбатом 20 (TWEEN-20®) в PBS. Коли планшети висують, додають 150 мкл/ямка сцинтилянта (MICROSCINT-20™, Packard) та планшети підраховують на гамма-лічильнику TOPCOUNT™ (Packard) протягом десяти хвилин. Концентрації кожного Fab, які дають менш ніж або рівні 20 % максимального зв'язування, обирають для використання в аналізах конкурентного зв'язування.

Згідно з іншим варіантом здійснення винаходу, K_d вимірюється з використанням аналізатора поверхневого плазмонного аналізу BIACORE®. Наприклад, аналіз з використанням BIACORE®-2000 або BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Піскатуей, Нью-Джерсі) проводиться при 25 °C за допомогою імобілізованих антигенів CM5 в ~ 10 одиницях відповіді (RU). В одному варіанті здійснення винаходу, карбоксиметильовані чіпи біодеструктором декстрану (CM5, BIAcore, Inc.) активуються N-етил-N'- (3-диметиламінопропіл)-карбодіімідгідрохлоридом (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антиген розбавляють 10 мМ ацетатом натрію, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~ 0,2 мкМ) перед ін'єкцією зі швидкістю потоку 5 мкл/хв,

щоб отримати близько 10 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білка. Після ін'єкції антигена вводять 1М етаноламіну для блокування непрореагувавших груп. Для кінетичних вимірів дворазові серійні розведення Fab (0,78 нМ до 500 нМ) ін'єктують в PBS за допомогою 0,05 % поверхнево-активної речовини полісорбату 20 (TWEEN-20™) (PBST) при 25 °C зі швидкістю потоку приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (k_{on}) і швидкості дисоціації (k_{off}) розраховуються з використанням простої індивідуальної моделі прив'язки Ленгмюра (BIAcore® Evaluation Software версії 3.2) шляхом одночасної установки сенсорних діаграм асоціації і дисоціації. Константа рівноважної дисоціації (K_d) розраховується як відношення k_{off}/k_{on} . Див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999). Якщо швидкість потоку перевищує $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ методом поверхневого плазмонного резонансу вище, то швидкість потоку може бути визначена з використанням методу флуоресцентного гасіння, який вимірює збільшення або зменшення інтенсивності флуоресцентного випромінювання (збудження = 295 нм, емісія = 340 нм, смуга пропускання 16 нм) при 25 °C 20 нМ антиантигенного антитіла (Fab-форма) в PBS, pH 7,2, в присутності зростаючих концентрацій антигену, виміряних на спектрометрі, такому як обладнаний стоп-потокком спектрофотометр (Aviv Instruments) або спектрофотометр SLM-AMINCO™ серії 8000 (ThermoSpectronic) з кюветою, яка переміщується.

2. Стабільність антитіл

Винахід забезпечує антитіла з підвищеною стабільністю, наприклад, у порівнянні з антитілом проти VEGF, наприклад G6.31 (див., наприклад, Патент США № 7758859 і Публікацію міжнародної заявки № WO 2005/012359, які включені в цей опис за допомогою посилання у всій їх повноті). Стабільність антитіла може бути визначена з використанням будь-якого методу, відомого в цій галузі, наприклад, диференціальної скануючої флуориметрії (DSF), кругового дихроїзму (CD), внутрішньої флуоресценції білка, диференціальної скануючої калориметрії, спектроскопії, світлорозсіювання (наприклад, динамічного розсіювання світла (DLS) і статичного розсіювання світла (SLS), само-взаємодіюча хроматографія (SIC). Антитіло проти VEGF може мати, наприклад, підвищену температуру плавлення (T_m), температуру агрегації (T_{agp}) або інші показники стабільності в порівнянні з антитілом проти VEGF, наприклад G6.31.

У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло, представлене в цьому документі, має T_m , яка більше ніж або дорівнює близько 80 °C (наприклад, близько 81 °C, близько 82 °C, близько 83 °C, близько 84 °C, близько 85 °C, близько 86 °C, близько 87 °C, близько 88 °C, близько 89 °C, близько 90 °C, близько 91 °C, близько 92 °C або близько 93 °C). Наприклад, в деяких випадках, антитіло проти VEGF має T_m , яке більше ніж або дорівнює близько 83,5 °C (наприклад, близько 83,5 °C, близько 84 °C, близько 85 °C, близько 86 °C, близько 87 °C, близько 88 °C, близько 89 °C, близько 90 °C, близько 91 °C, близько 92 °C або близько 93 °C). У деяких випадках антитіло проти VEGF має T_m від близько 82 до близько 92 °C (наприклад, близько 82 °C, близько 83 °C, близько 84 °C, близько 85 °C, близько 86 °C, близько 87 °C, близько 88 °C, близько 89 °C, близько 90 °C, близько 91 °C або близько 92 °C). У деяких прикладах анти-VEGF антитіло має T_m близько 82 °C. У деяких випадках будь-яке з попередніх значень T_m антитіла проти VEGF визначають з використанням DSF. У деяких варіантах здійснення винаходу, значення T_m антитіла проти VEGF визначають, як описано в цьому документі, наприклад, в прикладі 1.

3. Фрагменти антитіл

У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло, представлене в цьому документі, являє собою фрагмент антитіла. Фрагменти антитіла включають, але не обмежуються ними, фрагменти Fab, Fab', Fab-C, Fab'-SH, F(ab')₂, Fv і scFv і інші фрагменти, описані нижче. Для огляду деяких фрагментів антитіл див. Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003). Для огляду scFv-фрагментів див., наприклад, Pluckthün, в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); див. також WO 93/16185; і патенти США № 557894 і 5587458. Для обговорення фрагментів Fab і F(ab')₂, що містять залишки епітопів, що зв'язують рецептор зв'язування, і мають збільшений період напіввиведення in vivo, див. патент США № 5660146.

Діатіла являють собою фрагменти антитіл з двома антигензв'язуючими сайтами, які можуть бути двовалентними або біспецифічними. Див., наприклад, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); і Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Триатіла і тетратіла також описані в публікації Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Однодоменні антитіла являють собою фрагменти антитіл, які повністю або частково містять варіабельний домен важкого ланцюга або повністю або частково містять варіабельний домен легкого ланцюга антитіла. У деяких варіантах здійснення винаходу, однодоменне антитіло являє собою однодоменне антитіло людини (Domantis, Inc., Уолт, Массачусетс, див., наприклад, патент США № 6248516 B1).

Фрагменти антитіл можуть бути отримані різними способами, включаючи, але не обмежуючись ними, протеолітичну перетравлення інтактного антитіла, а також продукування рекомбінантними клітинами-хазяями (наприклад, *E. coli* або фагом), як описано в даному документі.

5 4. Химерні і гуманізовані антитіла

У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло, представлене в цьому документі, являє собою химерне антитіло. Деякі химерні антитіла описані, наприклад, в патенті США № 4816567; і Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984). В одному прикладі химерне антитіло містить нелюдську варіабельну ділянку (наприклад, варіабельний домен, отриманий від миші, щура, хом'яка, кролика або не людини, наприклад мавпи) і константний домен людини. В іншому прикладі химерне антитіло являє собою антитіло з "класом перемикання", в якому клас або підклас був змінений від класу вихідного антитіла. Термін "химерні антитіла" включає антигензв'язуючі фрагменти таких антитіл.

У деяких варіантах реалізації химерне антитіло є гуманізованим антитілом. Як правило, нелюдське антитіло гуманізується для зниження імуногенності у людей, зберігаючи при цьому специфічність і афінність батьківського нелюдського антитіла. Як правило, гуманізоване антитіло містить один або більше варіабельних доменів, в яких HVR, наприклад CDR (або їхні частини), отримують з нелюдського антитіла, і FR (або їхні частини) отримують з послідовностей антитіл людини. Гуманізоване антитіло необов'язково також буде містити щонайменше частину константної ділянки людини. У деяких варіантах здійснення винаходу, деякі FR-залишки в гуманізованому антитілі заміщені відповідними залишками від нелюдського антитіла (наприклад, антитіло, з якого отримані HVR-залишки), наприклад, для відновлення або поліпшення специфічності антитіл або афінності.

Гуманізовані антитіла і способи їх отримання розглядаються, наприклад, в Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619-1633 (2008), і далі описані, наприклад, в Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989); патенти США № 5821337, 7527791, 6982321 і 7087409; Kashmiri et al., Methods 36: 25-34 (2005) (описує специфічність, яка визначає щеплення ділянки (SDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28: 489-498 (1991) (описує "зміну поверхні"); Dall'Acqua et al., Methods 36: 43-60 (2005) (описує "переміщення FR"); і Osbourn et al., Methods 36: 61-68 (2005) і Klimka et al., Br. J. Cancer, 83: 252-260 (2000) (описує підхід "відбору, який підганяється" до переміщення FR).

Каркасні ділянки людини, які можуть бути використані для гуманізації, включають, але не обмежуються ними: каркасні ділянки, обрані з використанням методу "найкращої відповідності" (див., наприклад, Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993)); каркасні ділянки, отримані з консенсусної послідовності людських антитіл конкретної підгрупи варіабельних ділянок легкого або важкого ланцюга (див., наприклад, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. США, 89: 4285 (1992); і Presta et al., J. Immunol., 151: 2623 (1993)); людські зрілі (соматично мутовані) каркасні ділянки або каркасні ділянки зародкової лінії людини (див., наприклад, Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619-1633 (2008)); і каркасні ділянки, отримані зі скринінгу FR-бібліотек (див., наприклад, Vasa et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) і Rosok et al., J. Biol. Chem. 271: 22611-22618 (1996)).

5. Антитіла людини

У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, запропоноване в цьому документі, являє собою антитіло людини. Людські антитіла можуть бути отримані з використанням різних методів, відомих в цій галузі техніки. Антитіла людини описані в загальних рисах в van Dijk і van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) і Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

Людські антитіла можуть бути отримані шляхом введення імуногена трансгенній тварині, яку було модифіковано для отримання інтактних людських антитіл або інтактних антитіл з варіабельними ділянками людини у відповідь на антигенну стимуляцію. Такі тварини зазвичай містять всі або частину локусів імуноглобулінів людини, які замінюють ендogenousні локуси імуноглобулінів, або які присутні поза хромосом, або інтегруються випадковим чином в хромосоми тварини. Як правило, у таких трансгенних мишей інактивовані ендogenousні локуси імуноглобулінів. Огляд способів отримання антитіл людини з трансгенних тварин див. в Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Див. також, наприклад, патенти США № 6075181 та 6150584, що описують технологію XENOMOUSE™; патент США № 5770429, що описує технологію HUMAB®; патент США № 7041870, що описує технологію K-M MOUSE®, і публікацію патентної заявки США № US 2007/0061900, що описує технологію VELOCIMOUSE®). Варіабельні ділянки людини з інтактних антитіл, які продукуються такими тваринами, можуть бути додатково модифіковані, наприклад, шляхом комбінування з іншою константною ділянкою людини.

Людські антитіла також можуть бути отримані за допомогою заснованих на гібридомі методах. Описані клітинні лінії людської мієломи і мишачо-людської гетеромієломи для виробництва людських моноклональних антитіл. (Див., наприклад, Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); і Boemer et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Антитіла людини, отримані за допомогою технології на основі В-клітинної гібридомі людини, також описані в Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3557-3562 (2006). Додаткові способи включають ті, які описані, наприклад, в патенті США № 7188926 (описує отримання моноклональних антитіл людини IgM з клітинних ліній гібридомі) і Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4): 265-268 (2006) (з описом гібридом людини-людина). Технологія на основі гібридомі людини (Trioma technology) також описана в статтях Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20 (3): 927-937 (2005) і Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27 (3): 185-91 (2005).

Антитіла людини також можна отримати шляхом ізолювання послідовностей варіабельного домену Fv-клону, обраних з бібліотек фагового дисплея людського походження. Такі послідовності варіабельного домену потім можна об'єднувати з бажаними константними доменами людини. Методики відбору антитіл людини з бібліотек антитіл описано нижче.

6. Антитіла, отримані з бібліотек

Антитіла відповідно до цього винаходу можна виділити шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек на предмет антитіл з бажаною активністю або активностями. Наприклад, в цій галузі відомі різні способи для створення бібліотек відображення фагів і скринінгу таких бібліотек на антитіла, що володіють бажаними характеристиками зв'язування. Такі методи розглядаються, наприклад, в Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., Ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) і далі описані, наприклад, в McCafferty et al., *Nature* 348: 552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); і Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

У деяких методах фагового дисплея, репертуари VH і VL-генів окремо клонуються полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР) і безладно рекомбінуються в фагових бібліотеках, які потім можуть бути піддані скринінгу на антигензв'язуючий фаг, як описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Фаг зазвичай відображає фрагменти антитіла у вигляді одностанцюгових Fv-фрагментів (scFv) або Fab-фрагментів. Бібліотеки з імунізованих джерел забезпечують високоафінні антитіла до імуногену без необхідності створення гібридом. Альтернативно, наївний репертуар може бути клонований (наприклад, від людини), щоб забезпечити єдине джерело антитіл до широкого спектру несамостійних, а також самостійних антигенів без будь-якої імунізації, як описано Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Нарешті, наївні бібліотеки можна також отримати шляхом синтезу, клонуючи сегменти V-генів стовбурових клітин, які не піддавалися перебудові, і використовуючи ПЛР-праймери, що містять випадкові послідовності, для кодування гіперваріабельної ділянки CDR3 і здійснення реаранжування *in vitro*, як описано в статті Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Патентні публікації, в яких описані фагів бібліотеки антитіл людини, включають, наприклад: Патент США № 5750373 і публікації патенту США № 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 і 2009/0002360.

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

7. Мультиспецифічні антитіла

У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло, представлене в цьому документі, являє собою мультиспецифічне антитіло, наприклад біспецифічне антитіло. Мультиспецифічними антитілами є моноклональні антитіла, які мають зв'язуючу специфічність щонайменше для двох різних сайтів. У деяких варіантах здійснення винаходу, одна зі специфічних характеристик зв'язування представлена для VEGF, а інша для будь-якого іншого антигену (наприклад, друга біологічна молекула, наприклад інтерлейкін-1 бета (IL-1 β), інтерлейкін-6 (IL-6); рецептор інтерлейкіну-6 (IL-6R), інтерлейкін-13 (IL-13), рецептор IL-13 (IL-13R), PDGF (наприклад, PDGF-BB); ангіопоетин; ангіопоетин 2 (Ang2), Tie2, S1P, інтегрини $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ і $\alpha 5\beta 1$, бетацеллюлін, апелін/APJ; еритропоетин; фактор комплементу D; TNF α , HtrA1; рецептор VEGF (наприклад, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, мембрано-пов'язаний VEGF-рецептор (mbVEGFR) або розчинний рецептор VEGF (sVEGFR)), рецептор ST-2; і білки, генетично пов'язані з ризиком вікової макулярної дегенерації (AMD), такі як компоненти комплементу шляху C2, фактор В, фактор Н,

CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HtrA1; ARMS2, TIMP3, HLA, інтерлейкін-8 (IL-8), CX3CR1, TLR3, TLR4, CETP, LIPC, COL10A1 і TNFRSF10A. Відповідно, біспецифічне антитіло може мати специфічність зв'язування для VEGF і IL-1 β ; VEGF і IL-6; VEGF і IL-6R; VEGF і IL-13; VEGF і IL-13R; VEGF і PDGF (наприклад, PDGF-BB); VEGF і ангіопоетин; VEGF і Ang2; VEGF і Tie2; VEGF і S1P; VEGF і інтегрин $\alpha v \beta 3$; VEGF і інтегрин $\alpha v \beta 5$; VEGF і інтегрин $\alpha 5 \beta 1$; VEGF і бетацеллюлін; VEGF і апелін/APJ; VEGF і еритропоетин; VEGF і фактор комплементу D; VEGF і TNF α ; VEGF і HtrA1; VEGF і VEGF-рецептор (наприклад, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR або sVEGFR); VEGF і ST-2 рецептор; VEGF і C2; VEGF і фактор B; VEGF і фактор H; VEGF і CFHR3; VEGF і C3b; VEGF і C5; VEGF і C5a; VEGF і C3a; VEGF і ARMS2; VEGF і TIMP3; VEGF і HLA; VEGF і IL-8; VEGF і CX3CR1; VEGF і TLR3; VEGF і TLR4; VEGF і CETP; VEGF і LIPC; VEGF і COL10A1; або VEGF і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення винаходу, біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з двома різними епітопами VEGF. Біспецифічні антитіла також можуть бути використані для локалізації цитотоксичних агентів в клітинах, які експресують VEGF. Біспецифічні антитіла можуть бути отримані як повнорозмірні антитіла або фрагменти антитіл (наприклад, Fab, Fab' або Fab-C фрагменти).

У деяких випадках біспецифічне антитіло являє собою біспецифічне анти-VEGF/анти-ангіопоетин 2 (Ang2) антитіло, описане в заявці на патент США № US 2014/0017244, яка включена в цей документ шляхом посилання в усій її повноті. Наприклад, біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло може включати перший зв'язуючий домен, який пов'язує VEGF (такий як будь-яке з антитіл проти VEGF, описаних в цьому документі), і другий зв'язуючий домен, який зв'язує Ang2, який включає (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність GYYMH (SEQ ID NO: 62); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO: 63); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SPNPYYYDSSGYYPGAFDI (SEQ ID NO: 64); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO: 65); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність DDSDRPS (SEQ ID NO: 66); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QVWDSSSDHWV (SEQ ID NO: 67), або комбінацію одного або більше з вищевказаних HVR і одного або більше його варіантів, що мають щонайменше близько 80 % ідентичності послідовності (наприклад, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності) до будь-якої з SEQ ID NO: 62-67.

У деяких випадках біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло може включати перший зв'язуючий домен, який зв'язує VEGF (такий як будь-яке з анти-VEGF антитіл, описаних в цьому документі), і другий зв'язуючий домен, який зв'язується з Ang2 і включає(ють) VH-домен, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80 % ідентичності послідовності (наприклад, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовності) або послідовності SEQ ID NO: 68; (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80 % ідентичності послідовності (наприклад, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовності) або послідовності SEQ ID NO: 69; або (c) домен VH, як в (a), і домен VL, як в (b).

У деяких випадках біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло може включати в себе перший зв'язуючий домен, який зв'язує VEGF (такий як будь-яке з анти-VEGF антитіл, описаних в цьому документі), і другий зв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з Ang2, причому другий зв'язуючий домен являє собою будь-який зв'язуючий антитіло домен, описаний в публікації міжнародної патентної заявки № WO 2010/069532, який включено в цей документ за допомогою посилання в повному обсязі, або його варіант.

В інших випадках біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло являє собою будь-який біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло, описане в публікації міжнародної патентної заявки № WO 2016/073157.

У деяких випадках біспецифічне антитіло являє собою біспецифічне анти-VEGF/анти-IL-6 антитіло. У деяких випадках біспецифічне анти-VEGF/анти-IL-6 антитіло може включати перший зв'язуючий домен, який зв'язує VEGF (такий як будь-яке з антитіл проти VEGF, описаних в цьому документі), і другий зв'язуючий домен, який пов'язує IL-6. Другий зв'язуючий домен може бути зв'язуючим доменом будь-якого анти-IL-6 антитіла, відомого в цій галузі, наприклад, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics, див., наприклад, WO 2016/073890, який включено в цьому документі за допомогою посилання у всій його повноті), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, есилімомаб, герилізмумаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 або їх варіант.

У деяких випадках біспецифічне антитіло являє собою біспецифічне анти-VEGF/анти-IL-6R антитіло. У деяких випадках біспецифічне анти-VEGF/анти-IL-6R антитіло може включати

перший зв'язуючий домен, який зв'язує VEGF (такий як будь-яке з антитіл проти VEGF, описаних в цьому документі), і другий зв'язуючий домен, який зв'язує IL-6R. Другий зв'язуючий домен може бути зв'язуючим доменом будь-якого анти-IL-6R антитіла, відомого в цій галузі, наприклад, тоцилізумаб (ACTEMRA®) (див., наприклад, WO 1992/019579, який включено до цей документ за допомогою посилання у всій його повноті) сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237 або його варіант.

Способи отримання мультиспецифічних антитіл включають, але не обмежуються ними, рекомбінантну ко-експресію двох пар важкого-легкого ланцюгів імуноглобуліну, що мають різну специфічність (див. Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)), WO 93/08829 і Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991)) і сконструйовані "виступ-в-западину" (див., наприклад, патент США № 5731168). Мультиспецифічні антитіла також можуть бути отримані за допомогою сконструйованих електростатичних керуючих ефектів для отримання Fc-гетеродимерних молекул антитіл (WO 2009/089004A1); зшивання двох або більше антитіл або фрагментів (див., наприклад, патент США № 4676980 і Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)); з використанням лейцинових блискавок для отримання біспецифічних антитіл (див., наприклад, Kostelny et al., J. Immunol., 148 (5): 1547-1553 (1992)); використовуючи технологію "діатіл" для отримання біспецифічних фрагментів антитіл (див., наприклад, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)); і з використанням одноланцюгових димерів Fv (sFv) (див., наприклад, Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994)); і отримання триспецифічних антитіл, як описано, наприклад, в Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991).

В цей документ також включені сконструйовані антитіла з трьома або більше функціональними сайтами зв'язування антигену, включаючи "антитіла-восьминоги" (див., наприклад, US 2006/0025576A1).

Антитіло або фрагмент з цього документу також включає "подвійний діючий FAb" або "DAF", що містить сайт зв'язування антигену, який зв'язується з VEGF, а також з іншим, відмінним антигеном (див., наприклад, US 2008/0069820).

8. Варіанти антитіл

У деяких варіантах здійснення винаходу, пропонуються варіанти амінокислотних послідовностей (наприклад, варіанти антитіл, включаючи одне або більше змін амінокислотних залишків) антитіл, представлених в даному документі. Наприклад, може бути бажаним поліпшити афінність зв'язування і/або інші біологічні властивості антитіла. Варіанти амінокислотних послідовностей антитіла можна отримати шляхом внесення відповідних модифікацій в нуклеотидну послідовність, що кодує антитіло, або шляхом пептидного синтезу. Такі модифікації включають, наприклад, делеції з, і/або вставки в, і/або заміни залишків в амінокислотних послідовностях антитіла. Будь-яка комбінація делеції, вставки і заміщення може бути виконана для досягнення кінцевої конструкції, за умови, що кінцева конструкція володіє необхідними характеристиками, наприклад, зв'язуванням антигену.

а) Варіанти заміни, вставки і делеції

У деяких варіантах здійснення винаходу пропонуються варіанти антитіл, що містять одну або більше амінокислотні заміни. Сайти, що представляють інтерес для замісного мутагенезу, включають HVR і FR. Консервативні заміни показані в таблиці 1 під заголовком "кращі заміни". Більш суттєві зміни наводяться в таблиці 1 під заголовком "ілюстративні заміни" і як додатково описано нижче щодо класів бічного ланцюга амінокислот. Амінокислотні заміни можуть бути введені в антитіло, яке представляє інтерес, а продукти, скриніровані для бажаної активності, наприклад, зберігають/покращують зв'язування антигену, зменшують імуногенність або покращують ADCC або CDC.

Таблиця 1

Оригінальний Залишок	Ілюстративні заміни	Переважаючі 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

Таблиця 1

Оригінальний Залишок	Ілюстративні заміни	Переважні заміни
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 згрупувати за загальними властивостями бічного ланцюга:

(1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

5 (3) кислі: Asp, Glu;

(4) основні: His, Lys, Arg;

(5) залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro;

(6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

10 Неконсервативні заміни тягнуть за собою обмін членом одного з цих класів на член іншого класу.

Один тип заміщуючого варіанту включає заміщення одного або більше залишків гіперваріабельної ділянки і/або залишків FR з вихідного антитіла (наприклад, гуманізованого або людського антитіла). Як правило, результуючий варіант(и), обрані для подальшого вивчення, матиме модифікації (наприклад, поліпшення) в певних біологічних властивостях (наприклад, підвищена афінність, підвищена стабільність, підвищена експресія, змінений рІ і/або знижена імуногенність) щодо вихідного антитіла і/або будуть по суті збережені певні біологічні властивості вихідного антитіла. Типовим варіантом заміщення є афінно дозріле антитіло, яке може бути зручно згенероване, наприклад, з використанням методів дозрівання афінності заснованому на фаговому дисплеї, таких як описані в цьому документі. Якщо коротко, 15 один або більше залишків HVR мутують, а варіанти антитіл відображаються на фагові і піддаються скринінгу на конкретну біологічну активність (наприклад, афінність зв'язування).

20 Зміни (наприклад, заміни) можуть бути зроблені в HVR, наприклад, для поліпшення афінності антитіла. Такі зміни можуть бути зроблені в "гарячих точках" HVR, тобто в залишках, що кодуються кодонами, які піддаються мутації з високою частотою під час процесу соматичного дозрівання (див., наприклад, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207: 179-196 (2008)), і/або залишки, 25 які контактують з антигеном, причому отриманий варіант VH або VL тестують на афінність зв'язування. Дозрівання афінності шляхом побудови і повторного вибору з вторинних бібліотек було описано, наприклад, в Hoogenboom et al., Methods in Molecular Biology 178: 1-37 (O'Brien et al., Ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). У деяких варіантах здійснення, дозрівання афінності, 30 відмінність вводиться в варіабельні гени, обрані для дозрівання будь-яким з безлічі способів

(наприклад, підвладна помилкам ПЛР, перетасування ланцюгів або олігонуклеотид-спрямований мутагенез). Потім створюється вторинна бібліотека. Потім бібліотеку піддають скринінгу для ідентифікації будь-яких варіантів антитіл з бажаною афінністю. Інший спосіб введення різноманітності включає в себе HVR-орієнтовані підходи, в яких рандомізовано кілька HVR-залишків (наприклад, 4-6 залишків за раз). HVR-залишки, які беруть участь у зв'язуванні антигену, можуть бути специфічно ідентифіковані, наприклад, з використанням аланін скануючого мутагенезу або моделювання. CDR-H3 і CDR-L3, зокрема, часто націлені.

У деяких варіантах здійснення винаходу, заміни, вставки або делеції можуть відбуватися в межах одного або більше HVR, поки такі зміни суттєво не зменшують здатність антитіла зв'язувати антиген. Наприклад, консервативні зміни (наприклад, консервативні заміни, як зазначено в цьому документі), які суттєво не зменшують афінність зв'язування, можуть бути зроблені в HVR. Такі зміни можуть, наприклад, перебувати поза антигензв'язуючих залишків в HVR. У деяких варіантах здійснення варіантів VH і VL послідовностей, представлених вище, кожен HVR або не змінюється, або містить не більше однієї, двох або трьох амінокислотних заміни.

У деяких варіантах здійснення винаходу, заміни, вставки або делеції можуть відбуватися в межах одного або більше FR, поки такі зміни суттєво не зменшують здатність антитіла зв'язувати антиген. Такі зміни можуть, наприклад, покращувати афінність антитіла і/або стабільність (наприклад, відповідно до підвищеної температури плавлення).

Корисний спосіб ідентифікації залишків або ділянок антитіла, які можуть бути націлені на мутагенез, називається "аланіновий скануючий мутагенез", як описано в статті Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. У цьому способі залишок або групу цільових залишків (наприклад, заряджені залишки, такі як Arg, Asp, His, Lys і Glu) ідентифікують і замінюють нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою (наприклад, аланіном або поліаланіном), щоб визначити чи впливає на взаємодію антитіла з антигеном. Подальші заміни можуть бути введені в місцях амінокислот, які демонструють функціональну чутливість до вихідних заміни. В альтернативному або додатковому варіанті формують кристалічну структуру антиген-антитіло для ідентифікації точок контакту між антитілом і антигеном. Такі контактні залишки й сусідні залишки можна піддавати спрямованому впливу або виключати з кандидатів для заміни. Варіанти можна піддавати скринінгу з метою визначення наявності у них бажаних властивостей.

Вставки в амінокислотну послідовність включають аміно- і/або карбоксил-кінцеві злиття довжиною від одного залишку до поліпептидів, що містять сто або більше залишків, а також вставки одного або безлічі амінокислотних залишків всередині послідовності. Приклади кінцевих вставок включають антитіло з N-кінцевим метіонільним залишком. Інші варіанти вставки молекули антитіла включають злиття з N- або C-кінцем антитіла з ферментом (наприклад, для ADEPT) або поліпептидом, які збільшують період напіввиведення антитіла в сироватці.

b) Варіанти глікозилювання

У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло, запропоноване в цьому документі, модифікують з метою збільшення або зменшення ступеня глікозилювання антитіла. Додавання або делецію сайтів глікозилювання в антитілі легко здійснити шляхом модифікації амінокислотної послідовності, яка призводить до створення або видалення одного або більше сайтів глікозилювання.

Якщо антитіло містить Fc-ділянку, то можна модифікувати вуглевод, приєднаний до неї. Нативні антитіла, які продукуються клітинами ссавців, зазвичай включають розгалужений біантеннарний олігосахарид, який зазвичай приєднаний N-зв'язком до Asn297 домену CH2 Fc-ділянки. Див., наприклад, Wright et al., TIBTECH 15: 26-32 (1997). Олігосахарид може включати різні вуглеводи, наприклад манозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу і сіалову кислоту, а також фукозу, прикріплену до GlcNAc в "стеблі" біантеннарної олігосахаридної структури. У деяких варіантах здійснення винаходу, модифікації олігосахариду в антитілі винаходу можуть бути зроблені для створення варіантів антитіл з деякими поліпшеними властивостями.

В одному варіанті здійснення винаходу, пропонуються варіанти антитіл, які мають вуглеводну структуру, яка не містить фукозу, прикріплену (прямо чи опосередковано) до Fc-ділянки. Наприклад, кількість фукози в такому антитілі може становити від 1 % до 80 %, від 1 % до 65 %, від 5 % до 65 % або від 20 % до 40 %. Кількість фукози визначають шляхом розрахунку середньої кількості фукози у вуглеводному ланцюгу при Asn297 по відношенню до суми всіх вуглеводних структур, приєднаних до Asn 297 (наприклад, складних гібридних структур з високим вмістом манози), яка вимірюється за допомогою MALDI-TOF-мас-спектрометрії, як описано, наприклад, в WO 2008/077546. Asn297 відноситься до залишку аспарагіну,

розташованому приблизно в положенні 297 в Fc-ділянці (ЄС-нумерація залишків Fc-ділянок); тим не менш, Asp297 також може бути розташований на відстані близько ± 3 амінокислот до або після положення 297, тобто, між положеннями 294 і 300, з огляду на незначні варіації послідовності в антитілі. Такі варіанти фукозилювання можуть мати поліпшену функцію ADCC.

Див., наприклад, публікацію патенту США № US 2003/0157108; US 2004/0093621. Приклади публікацій, що відносяться до варіантів "дефукозилюваного" або "фукозо-дефіцитного" антитіла, включають: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al., J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Прикладами клітинних ліній, здатних продукувати дефукозилювані антитіла, є клітини Lec13 CHO, дефіцитні в фукозилюванні білка (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986)); заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; і WO 2004/056312 A1, Adams et al., особливо в прикладі 11), і нокаутні клітинні лінії, такі як ген альфа-1,6-фукозилтрансферази, FUT8, нокаутні клітини CHO (див., наприклад, Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); і WO2003/085107).

Варіанти антитіл додатково представлені розділеними навіпіл олігосахаридами, наприклад, в яких біантеннарний олігосахарид, приєднаний до Fc-ділянки антитіла, ділять навіпіл за допомогою GlcNAc. Такі варіанти антитіл можуть мати зменшене фукозилювання і/або поліпшену функцію ADCC. Приклади таких варіантів антитіл описані, наприклад, в WO 2003/011878; Патенті США № 6602684; і US 2005/0123546 (Umana et al.). Також передбачені варіанти антитіл з щонайменше одним галактозним залишком в олігосахариді, приєднаному до Fc-ділянки. Такі варіанти антитіл можуть мати поліпшену функцію CDC. Такі варіанти антитіл описані, наприклад, в WO 1997/30087; WO 1998/58964; і WO 1999/22764 (Raju, S.).

с) Варіанти Fc-ділянки

У деяких варіантах здійснення винаходу, одна чи більше модифікацій амінокислот можуть бути введені в Fc-ділянку антитіла, представленого в цьому документі, тим самим генеруючи варіант Fc-ділянки. Варіант Fc-ділянки може містити послідовність Fc-ділянки людини (наприклад, Fc-ділянку IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини), що містить зміну амінокислотного залишку (наприклад, заміщення) в одному або більше положеннях амінокислоти. У деяких варіантах здійснення, винахід розглядає варіант антитіла, яке володіє деякими, але не всіма ефекторними функціями, які роблять його бажаним кандидатом для застосувань в яких період напіввиведення антитіла *in vivo* є важливим, але деякі ефекторні функції (такі як комплемент і ADCC) не потрібні або шкідливі. Аналізи цитотоксичності *in vitro* і/або *in vivo* можуть проводитися для підтвердження зменшення/виснаження CDC і/або ADCC активності. Наприклад, можуть бути проведені аналізи зв'язування Fc-рецептора (FcR), щоб гарантувати, що антитіло не має FcγR-зв'язування (отже, ймовірно, не має активності ADCC), але зберігає здатність FcRn-зв'язування. Первинні клітини для опосередкування ADCC, NK-клітини, експресують тільки FcγRIII, тоді як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Експресія FcR на гематопоетичних клітинах приведена в таблиці 3 на стор. 464 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991).

Необмежуючі приклади аналізів *in vitro* для оцінки активності ADCC молекули, яка представляє інтерес, описані в патенті США № 5500362 (див., наприклад, Hellstrom et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) і Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); патенті США № 5821337; і Bruggemann et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Альтернативно, можуть бути використані способи нерадіоактивного аналізу (див., наприклад, аналіз Нерадіоактивної цитотоксичності АСТІ™ для проточної цитометрії (CellTechnology, Inc. Mountain View, Каліфорнія; і CYTOTOX 96® не радіоактивний аналіз цитотоксичності (Promega, Медісон, Вісконсін). Корисні ефекторні клітини для таких аналізів включають моноклеарні клітини периферичної крові (PBMС) і клітини природніх кілерів (NK). Альтернативно або додатково, активність ADCC молекули, яка представляє інтерес, може бути оцінена *in vivo*, наприклад, в моделі на тваринах, такій як описана в Clynes et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Аналізи зв'язування C1q також можуть бути проведені для підтвердження того, що антитіло здатне зв'язувати C1q і, отже, не володіє активністю CDC. Див., наприклад, C1q і C3с зв'язування в ІФА в WO 2006/029879 і WO 2005/100402. Для оцінки активації комплементу може бути проведений аналіз CDC (див., наприклад, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg et al., Blood 101:1045-1052 (2003); і Cragg et al., Blood 103:2738-2743 (2004)). Зв'язування FcRn і визначення *in vivo* кліренсу/напіввиведення також

можуть бути виконані з використанням методів, відомих в цій галузі (див., наприклад, Petkova et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Антитіла зі зниженою ефекторною функцією включають антитіла з заміною одного або більше залишків 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 Fc-ділянки (патент США № 6737056). Такі Fc-мутанти включають Fc-мутантів з замінами в двох або більше амінокислотних положеннях 265, 269, 270, 297 і 327, включаючи так звані Fc-мутанти "DANA" з 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 варіантах здійснення винаходу, варіант антитіла включає Fc-ділянку з однією або більше амінокислотними замінами, які покращують ADCC, наприклад, заміщення в положеннях 298, 333 і/або 334 Fc-ділянці (нумерація залишків ЕС).

У деяких варіантах здійснення винаходу, в Fc-ділянці відбуваються зміни, які призводять до зміни (наприклад, поліпшеному або зменшеному) зв'язування C1q і/або комплементарної залежної цитотоксичності (CDC), наприклад, як описано в патенті США № 6195551, WO 99/51642 і Idusogie et al., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Антитіла зі збільшеним періодом напіввиведення і поліпшеним зв'язуванням з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), який відповідає за передачу IgG матері плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) і Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), описані в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Зазначені антитіла містять Fc-ділянку з однією або більше замінами, які покращують зв'язування Fc-ділянки з FcRn. Такі варіанти Fc включають ті, у яких є заміни в одному або більше залишках Fc-ділянки: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, заміщення Fc-ділянки залишку 434 (патент США № 7371826). 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.

d) Варіанти антитіл, сконструйованих з цистеїном

У деяких варіантах здійснення винаходу, може бути бажано створити цистеїн-сконструйовані антитіла, наприклад, "thioMAbs", в яких один або більше залишків антитіла замінені залишками цистеїну. У конкретних варіантах реалізації винаходу, замінені залишки розташовані в доступних сайтах антитіла. В результаті заміщення зазначених залишків цистеїном в доступних ділянках антитіла розташовуються реакційноздатні тиольні групи, які можна використовувати для кон'югування антитіла з іншими групами, наприклад, лікарськими речовинами або групами "лінкер-лікарська речовина" з отриманням імунокон'югата, як додатково описано в цьому документі. У деяких варіантах реалізації винаходу, можна замінити на цистеїн один або більше з таких залишків: V205 (нумерація Кабат) легкого ланцюга; A118 (нумерація ЕС) важкого ланцюга; і S400 (нумерація ЕС) Fc-ділянки важкого ланцюга. Цистеїн-сконструйовані антитіла можуть бути отримані, як описано, наприклад, в патенті США № 7521541.

e) Похідні антитіл

У деяких варіантах реалізації винаходу, антитіло, запропоноване в цьому документі, можна додатково модифікувати шляхом введення додаткових небілкових фрагментів, відомих в цій галузі техніки і легко доступних. Групи, які підходять для дериватизації антитіла, включають, але не обмежуються ними, водорозчинні полімери. Необмежуючі приклади водорозчинних полімерів включають, але не обмежуються ними, поліетиленгліколь (ПЕГ), сополімери етиленгліколю/пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлози, декстрану, полівінілового спирту, полівінілпіролідону, полі-1, 3-діоксолан, полі-1,3,6-тріоксану, сополімер етилену/малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (гомополімери або випадкові сополімери) і декстран або полі(н-вінілпіролідон)поліетиленгліколю, гомополімери пропіленгліколю, сополімери проліпропіленоксида/етиленоксида, поліоксietильовані поліоли (наприклад, гліцерин), полівініловий спирт і їх суміші. Пропіональдегід поліетиленгліколю може мати переваги у виробництві завдяки його стабільності в воді. Зазначений полімер може мати будь-яку молекулярну масу і бути розгалуженим або нерозгалуженим. Кількість полімерів, прикріплених до антитіла, може змінюватися, і якщо до нього прикріплене більше одного полімеру, вони можуть бути однаковими або різними молекулами. Загалом, кількість і/або тип полімерів, використовуваних для дериватизації, можуть бути визначені на основі міркувань, що включають, але не обмежуючись ними, конкретні властивості або функції антитіла, яке поліпшується, незалежно від того, чи буде похідне антитіла використовуватися при терапії в певних умовах і таке інше. Додаткові кон'югати антитіл описані в цьому документі, наприклад, в розділі K нижче і в прикладі 13.

В іншому варіанті здійснення винаходу, передбачені кон'югати антитіла і небілкового фрагмента, які можуть вибірково нагріватися під впливом радіації. В одному варіанті здійснення винаходу, небілкова частина являє собою вуглецеву нанотрубку (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). Випромінювання може мати будь-яку довжину хвилі і включає в себе, але не обмежується ними, довжини хвиль, які не шкодять звичайним клітинам, але які нагрівають небілкову частину до температури, при якій клітини, проксимальні до антитіло-непротеїнових частини, гинуть.

f) Варіанти ізоелектричної точки

Винахід пропонує варіанти антитіл зі зміненими ізоелектричними точками. Наприклад, винахід відноситься до варіантів антитіл зі зменшеною ізоелектричною точкою (pI), наприклад, у порівнянні з антитілом проти VEGF, наприклад G6.31. У деяких випадках поверхневий заряд знижується при фізіологічному pH. У деяких випадках антитіло проти VEGF має pI, рівне або менше ніж близько 8 (наприклад, близько 8, близько 7, близько 6, близько 5 або близько 4). У деяких випадках антитіло має pI від близько 4 до близько 8 (наприклад, близько 5, близько 5, близько 6, близько 7 або близько 8). У деяких випадках антитіло проти VEGF має pI від близько 5 до близько 7 (наприклад, близько 5, близько 6 або близько 7). У деяких випадках антитіло проти VEGF має pI від близько 5 до близько 6 (наприклад, близько 5,1, близько 5,2, близько 5,3, близько 5,4, близько 5,5, близько 5,6, близько 5,7, близько 5,8, близько 5,9 або близько 6).

Антитіла цього винаходу можуть бути сконструйовані так, щоб мати зменшений pI, наприклад, шляхом заміщення амінокислотних залишків дикого типу в цьому положенні амінокислотою, що має більш низький pI. pI амінокислоти можна визначити на основі значень pKa аміну (-NH₂), карбонової кислоти (-COOH) і амінокислоти з бічним ланцюгом, які відомі в цій галузі. У деяких варіантах здійснення винаходу, амінокислотні залишки, що експонуються на поверхні, можуть бути заміщені для зменшення pI антитіла. В одному варіанті здійснення винаходу, експоновані на поверхні амінокислотні залишки можуть бути заміщені глутаматом (E). В одному варіанті здійснення винаходу, експоновані на поверхні амінокислотні залишки можуть бути заміщені аспартатом (E).

В. Реконбінантні способи і композиції

Будь-яке з антитіл (наприклад, антитіла проти VEGF), описаних в цьому документі, може бути отримано з використанням реконбінантних способів і композицій, наприклад, як описано в патенті США № 4816567. В одному варіанті здійснення винаходу, надається ізольована нуклеїнова кислота, що кодує антитіло проти VEGF, описане в цьому документі. Така нуклеїнова кислота може кодувати амінокислотну послідовність, яка містить VL, і/або амінокислотну послідовність, яка містить VH антитіла (наприклад, легкі і/або важкі ланцюги антитіла). У наступному варіанті здійснення винаходу, передбачається один або більше векторів (наприклад, векторів експресії), що містять таку нуклеїнову кислоту. У наступному варіанті здійснення винаходу, пропонується клітина-хазяїн, що містить таку нуклеїнову кислоту. В одному з таких варіантів здійснення винаходу, клітина-хазяїн містить (наприклад, була перетворена з): (1) вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка містить VL антитіла, і амінокислотну послідовність, яка містить VH антитіла, або (2) перший вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка містить VL антитіла, і другий вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка містить VH антитіла. В одному варіанті здійснення винаходу, клітина-хазяїн є еукаріотичною, наприклад, клітиною яєчника китайського хом'ячка (CHO) або лімфоїдною клітиною (наприклад, Y0, NS0, клітиною Sp20). В одному варіанті здійснення винаходу, пропонується спосіб отримання антитіла проти VEGF, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло, як зазначено вище, в умовах, що підходять для експресії антитіла, і, необов'язково, виділення антитіла з клітини-хазяїна (або середовища культивування клітин-хазяїв).

Для реконбінантного продукування антитіла проти VEGF, нуклеїнових кислот, що кодує антитіло, наприклад, як описано вище, ізолюють і вставляють в один або більше векторів для подальшого клонування і/або експресії в клітині-хазяїні. Така нуклеїнова кислота може бути легко виділена і сіквенована з використанням звичайних процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, які здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкий і легкий ланцюг антитіла).

Відповідні клітини-хазяї для клонування або експресії векторів, що кодують антитіло, включають прокаріотичні або еукаріотичні клітини, описані в цьому документі. Наприклад, антитіла можуть бути отримані в бактеріях, зокрема, коли глікозилування і Fc-ефекторна функція не потрібні. Для експресії фрагментів антитіл і поліпептидів в бактеріях див., наприклад, патенти США № 5648237, 5789199 та 5840523. Див. також Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (BKC

Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, що описує експресію фрагментів антитіл в *E.coli*. Після експресії антитіло може бути виділено з пасти бактеріальних клітин в розчинній фракції і може бути додатково очищено.

На додаток до прокаріотів, еукаріотичні мікроорганізми, такі як нитчасті гриби або дріжджі, є підходящими хазяями для клонування або експресії векторів, що кодують антитіло, включаючи гриби і дріжджові штами, чиї шляхи глікозилювання можуть бути "гуманізовані", що призводить до отримання антитіла з частково або повністю людським типом глікозилювання. Див. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), і Li et al., *Nat. Biotech.* 24: 210-215 (2006).

Придатні для експресії глікозилюваного антитіла клітини-хазяї також можна отримати з багатоклітинних організмів (безхребетних і хребетних). Приклади клітин безхребетних включають клітини рослин і комах. Були ідентифіковані численні бакуловірусні штами, які можна використовувати в поєднанні з клітинами комах, особливо для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*.

Культури клітин рослин також можуть бути використані в якості хазяїв. Див., наприклад, патенти США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 та 6417429 (описують технологію PLANTIBODIES™ для виробництва антитіл в трансгенних рослинах).

Клітини хребетних можуть також використовуватися в якості хазяїв. Наприклад, можуть бути корисні клітинні лінії ссавців, які пристосовані для росту в суспензії. Іншими прикладами корисних клітинних ліній ссавців є лінія CV1 нирки мавпи, трансформована за допомогою SV40 (COS-7); лінія клітин ембріональної нирки людини (293 або 293 клітини, як описано, наприклад, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клітини нирок дитинча хом'яка (BHK); клітини миші Сертолі (клітини TM4, як описано, наприклад, в Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); клітини нирок мавпи (CV1); клітини нирок африканської зеленої мавпи (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); (MDCK, клітини печінки щура-буйвола (BRL 3A), клітини легенів людини (W138), клітини печінки людини (Hep G2), пухлина молочної залози миші (MMT 060562), клітини TRI, як описано, наприклад, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982); клітини MRC 5; і клітини FS4. Інші корисні клітинні лінії клітин ссавців включають клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), включаючи клітини DHFR-CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); і клітинні лінії мієломи, такі як Y0, NS0 і Sp2/0. Для огляду певних ліній клітин-хазяїв ссавців, придатних для продукування антитіл, див., наприклад, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (BKC Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

C. Аналізи

Запропоновані в цьому документі антитіла проти VEGF, а також композиції, які включають антитіла проти VEGF (наприклад, будь-яке антитіло проти VEGF, представлене в цьому документі), такі як кон'югати антитіл, злиті білки і полімерні препарати, можуть бути ідентифіковані, скриніровані або охарактеризовані за їх фізико-хімічними властивостями і/або біологічній активності за допомогою різних аналізів, відомих в цій галузі.

1. Аналізи зв'язування і інші аналізи

В одному аспекті антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок або його полімерний склад випробовують на його антигензв'язуючу активність, наприклад, за допомогою відомих методів, таких як ІФА, Вестерн-блот і т. д.

В іншому аспекті конкурентні аналізи можуть бути використані для ідентифікації антитіла, яке конкурує з антитілом, як описано в цьому документі, або кон'югатом антитіла, злитим білком або його полімерною композицією для зв'язування з VEGF. У деяких варіантах здійснення винаходу, таке конкуруюче антитіло зв'язується з одним і тим же епітопом (наприклад, лінійним або конформаційним епітопом), який пов'язаний з антитілом, як описано в цьому документі. Докладні ілюстративні методи картування епітопа, з яким зв'язується антитіло, наведені в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Тотова, Нью-Джерсі).

В ілюстративному конкурентному аналізі іммобілізований VEGF інкубують в розчині, який містить перше мічене антитіло, яке зв'язується з VEGF, і друге немічене антитіло, яке тестується на його здатність конкурувати з першим антитілом для зв'язування з VEGF. Друге антитіло може бути присутнім в супернатанті гібридами. В якості контролю іммобілізований VEGF інкубують в розчині, який містить перше мічене антитіло, але не друге немічене антитіло. Після інкубації в умовах, що забезпечують зв'язування першого антитіла з VEGF, надмірне незв'язане антитіло видаляють і вимірюють кількість мітки, зв'язаної з іммобілізованим VEGF. Якщо кількість мітки, зв'язаної з іммобілізованим VEGF, істотно зменшується в тестованому зразку щодо контрольного зразка, то це вказує на те, що друге антитіло конкурує з першим

антитілом для зв'язування з VEGF. Див. Harlow and Lane (1988). Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Аналіз активності

В одному аспекті пропонуються аналізи для ідентифікації антитіл проти VEGF або кон'югатів антитіл, злитих білків або їх полімерних композицій, що мають біологічну активність. Біологічна активність може включати, наприклад, зв'язування з VEGF (наприклад, VEGF в потоці крові) або його пептидним фрагментом або *in vivo*, *in vitro*, або *ex vivo*. У деяких варіантах здійснення винаходу, біологічна активність може включати блокування або нейтралізацію VEGF або запобігання зв'язування VEGF з лігандом, наприклад, рецептором, таким як KDR або Flt-1. Також передбачені антитіла або кон'югати антитіл, злиті білки або їхні полімерні складки, що мають таку біологічну активність *in vivo* та/або *in vitro*. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок або його полімерний склад випробовують на таку біологічну активність.

3. Аналізи стабільності

В одному аспекті представлено аналізи для визначення стабільності (наприклад, термостабільності) антитіла проти VEGF, або кон'югату антитіла, злитого білка або його полімерної композиції. Наприклад, стабільність антитіла або кон'югату антитіла, злитого білка або його полімерного складу може бути визначена з використанням будь-якого методу, відомого в цій галузі техніки, наприклад, диференціальної скануючої флуориметрії (DSF), круговим дихроїзмом (CD), внутрішньої флуоресценції білка, диференціальної скануючої калориметрії, спектроскопії, світлорозсіювання (наприклад, динамічним розсіюванням світла (DLS) і статичним розсіюванням світла (SLS), само-взаємодіючою хроматографією (SIC). Стабільність аналізу може бути визначена, як описано в цьому документі, наприклад, використовуючи DSF, як описано, наприклад, в прикладах 1 і 2.

D. Імунокон'югати

Винахід також відноситься до імунокон'югатів, що містять антитіло проти VEGF, кон'юговані з одним або більше цитотоксичними агентами, такими як хіміотерапевтичні агенти або лікарські засоби, що інгібують зростання агенти, токсини (наприклад, білкові токсини, ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження або їхні фрагменти) або радіоактивні ізотопи.

В одному варіанті здійснення винаходу, імунокон'югат являє собою кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC), в якому антитіло кон'юговано з одним або більше лікарськими засобами, включаючи, але не обмежуючись ними, майтансиноїд (див. патенти США № 5208020, 5416064 та європейський патент EP 0 425 235 B1); аурістатин, такий як фрагменти DE і DF лікарського засобу монометилаурістатина (MMAE і MMAF) (див. патенти США № 5635483, 5780588 та 7498298); доластатин; каліхеаміцин або його похідне (див. патенти США № 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 і 5877296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); i Lode et al., Cancer Res. 58: 2925-2928 (1998)); антрациклін, такий як дауноміцин або доксорубіцин (див. Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45: 4336-4343 (2002); i патент США № 6630579); метотрексат; віндезин; таксани, такий як доцетаксел, паклітаксел, ларотаксел, тезетаксел і ортатаксел; трихотецени; i CC1065.

В іншому варіанті здійснення винаходу, імунокон'югат містить антитіло, як описано в цьому документі, кон'югованих з ферментативно активним токсином або його фрагментом, включаючи, але не обмежуючись ними, А ланцюг дифтерії, які не пов'язують активні фрагменти дифтерійного токсину, А ланцюг екзотоксину (від *Pseudomonas aeruginosa*), А ланцюг ріцину, А ланцюг абрина, А ланцюг модекцина, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантина, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор момордіка харантська, курцин, кротин, інгібітор *sapaonaria officinalis*, гелонін, мітогеллін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трихотецени.

В іншому варіанті здійснення винаходу, імунокон'югат містить антитіло, як описано в цьому документі, кон'юговано з радіоактивним атомом з утворенням радіокон'югата. Для виробництва радіокон'югатів є безліч радіоактивних ізотопів. Приклади включають At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} і радіоактивні ізотопи Lu. Коли радіокон'югат використовується для виявлення, він може містити радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад ^{99m}Tc або I^{123} , або мітку спина для отримання зображення ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (також відому як магнітно-резонансна томографія, МРТ), такий як йод-123 знову, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

Кон'югати антитіла і цитотоксичного агента можуть бути отримані із застосуванням безлічі біфункціональних, зв'язуючих білок агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піриділдитіо) пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4- (N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоефірів (такі як диметиладіпімідат HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідил суберат), альдегіди (такі як глутаровий альдегід), біс-азідопоєднання (такі як біс(п-азідобензоїл) гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс(п-діазонійбензоїл) - етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2, 4-динітробензол). Наприклад, імунотоксин рицину може бути отриманий, як описано в Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Вуглець-14-мічена 1-ізотіоціанатобензіл-3-метилдіетилентриамінпентауксусна кислота (MX-DTPA) являє собою ілюстративний хелатуючий агент для кон'югації радіонуклеотиду з антитілом. Див. WO94/11026. Лінкер може являти собою "відщеплюваний лінкер", який полегшує вивільнення цитотоксичної лікарської речовини в клітині. Наприклад, можна використовувати кислоточутливий лінкер, пептидазочутливий лінкер, фоточутливий лінкер, диметильний лінкер або дисульфід-містячий лінкер (Chari et al., Cancer Res. 52: 127-131 (1992); Патент США № 5208020).

Імунокон'югати або ADC явно розглядають в цьому документі, але не обмежуються ними, такі кон'югати, отримані за допомогою зшиваючих реагентів, включаючи, але не обмежуючись ними, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC і сульфо-SMPB і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон) бензоат), які є комерційно доступними (наприклад, від Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Іллінойс, США).

Е. Способи та композиції для очищення, діагностики і виявлення афінності

Антитіла цього винаходу можуть бути використані в якості агентів афінного очищення. У цьому процесі антитіла іммобілізують на твердій фазі, такій як смола SEPHADEX® або фільтрувальний папір, з використанням способів, добре відомих в цій галузі техніки. Іммобілізоване антитіло контактує зі зразком, що містить антиген, який підлягає очищенню, і після цього носій промивають відповідним розчинником, який видаляє по суті весь матеріал в зразку, за винятком антигену, який очищається, який пов'язаний з іммобілізованим антитілом. Нарешті, носій промивають іншим відповідним розчинником, таким як гліциновий буфер, pH 5,0, який вивільняє антиген з антитіла.

У деяких варіантах здійснення винаходу, будь-яке з антитіл проти VEGF, представлених в цьому документі, корисно для виявлення присутності VEGF в біологічному зразку. Використовуваний в цьому документі термін "виявлення" охоплює кількісне або якісне виявлення. У деяких варіантах здійснення винаходу, біологічний зразок містить клітину або тканину, таку як кров (наприклад, цільна кров, плазма і/або сироватка), зразки тканин (наприклад, зразки пухлин) тощо.

В одному варіанті здійснення винаходу, пропонується анти-VEGF антитіло для використання в способі діагностики або виявлення. У ще одному аспекті представлений спосіб виявлення присутності VEGF в біологічному зразку. У деяких варіантах здійснення винаходу, спосіб включає контактування біологічного зразка з антитілом проти VEGF, як описано в цьому документі, в умовах, які дозволяють зв'язування антитіла проти VEGF з VEGF, і визначення того, чи утворюється комплекс між антитілом проти VEGF і VEGF. Такий спосіб може бути способом *in vitro* або *in vivo*. В одному варіанті здійснення винаходу, антитіло проти VEGF використовують для відбору суб'єктів, які підходять для терапії антитілом проти VEGF, наприклад, де VEGF являє собою біомаркер для відбору пацієнтів.

Ілюстративні розлади, які можуть бути діагностовані з використанням антитіла по винаходу, включають порушення, пов'язані з патологічним ангіогенезом (наприклад, окулярні порушення і клітинні проліферативні порушення) і/або порушення, пов'язані з небажаною проникністю судин (наприклад, набряк, пов'язаний з пухлинами головного мозку, асцит, пов'язаний зі злоякісними новоутвореннями, синдром Мейга, запалення легенів, нефротичний синдром, перикардіальний випіт, плевральний випіт і проникність, пов'язані з серцево-судинними захворюваннями). У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD, суха AMD, проміжна AMD, прогресуюча AMD або географічна атрофія (GA)), дегенерацію жовтої плями, набряк макули, DME (наприклад, фокальний, нецентральний DME або дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (DR) (наприклад, проліферативну DR (PDR), непроліферативну DR (NPDR) або висотну DR), інші пов'язані з ішемією ретинопатії, ROP, оклюзію вени сітківки (RVO) (наприклад, центральну (CRVO) і розгалужену (BRVO) форми), CNV (наприклад, міопічну CNV), неоваскуляризацію рогівки, захворювання, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, захворювання, пов'язані з ретинальною/ хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічну короткозорість, хворобу фон

Хиппель-Ліндау, гістоплазмоз ока, FEVR, хвороба Коутса, хвороба Норрі, OPPG, субкон'юнктивальний крововилив, рубеоз, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярне глаукому, пігментний ретиніт (RP), гіпертонічну ретинопатію, ангіоматозну проліферацію сітківки, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію зіниці, внутрішньоочну неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, цистодний макулярний набряк (CME), васкуліт, папілломеду, ретиніт, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт, амавроз Лебера (також відомий як вроджений амароз Лебера або LCA), увеїт (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, багатофокальний хоріоїдит), очний гістоплазмоз, блефарит, сухість очей, травматичне пошкодження очей, хвороба Шегрена. У деяких випадках окулярний розлад являє собою ретинопатію, що включає проліферативну діабетичну ретинопатію, хоріоїдальну неоваскуляризацію (CNV), вікову дегенерацію жовтої плями (AMD), діабетичну і інші пов'язані з ішемією ретинопатії, діабетичний макулярної набряк (DME), патологічну короткозорість, хворобу фон Хіппель-Ліндау, гістоплазмоз ока, оклюзію вени сітківки (включаючи центральні (CRVO) і розгалужені (BRVO) форми), неоваскуляризацію рогівки, неоваскуляризацію сітківки, ретинопатію недоношених (ROP), сімейну ексудативну вітреоретинопатію (FEVR), хворобу Коутса, хворобу Норрі, синдром остеопороза-псевдогліоми (OPPG), субкон'юнктивальний крововилив або гіпертонічну ретинопатію. У деяких випадках клітинний проліферативний розлад являє собою рак. У деяких випадках, рак являє собою рак молочної залози, рак товстої кишки, недрібноклітинний рак легені, неходжкінську лімфому (НХЛ), рак нирки, рак передміхурової залози, рак печінки, рак голови та шиї, меланому, рак яєчників, мезотеліому або множинну мієлому.

У деяких варіантах здійснення винаходу, представлено мічені антитіла проти VEGF. Ці мітки включають, але не обмежуються ними, мітки або фрагменти, які виявляються безпосередньо (наприклад, флуоресцентні, хромофорні, електронно-щільні, хемілюмінесцентні і радіоактивні мітки), а також фрагменти, такі як ферменти або ліганди, які виявляються побічно, наприклад, за допомогою ферментативної реакції або взаємодії молекул. Ілюстративні мітки включають, але не обмежуються ними, радіоізотопи ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофори, такі як рідкоземельні хелати або флуоресцеїн, і його похідні, родамін і його похідні, дансил, умбелліферон, люцериферази, наприклад, люциферази світлячків і бактеріальна люцифераза (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофталазіндіони, пероксидаза хрому (HRP), лужна фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоамілаза, лізоцим, сахаридні оксидази, наприклад, глюкозооксидазу, галактозооксидазу і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу, гетероциклічні оксидази, такі як уриказа і ксантинооксидаза, в поєднанні з ферментом, який використовує перикис водню для окислення попередника барвника, такого як HRP, лактопероксидазу або мікропероксидазу, біотин/авідин, спінові мітки, мітки бактеріофага, стабільні вільні радикали, тощо.

В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло необхідно мітити, і його присутність може бути виявлено з використанням міченого антитіла, яке зв'язується з антитілом.

Антитіла цього винаходу можуть бути використані в будь-якому відомому аналітичному методі, такому як аналізи конкурентного зв'язування, прямі і непрямі сендвіч-аналізи і аналізи імунопреципітації. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Аналізи конкурентного зв'язування покладаються на здатність стандарту мічення конкурувати з аналізом тестового зразка для зв'язування з обмеженою кількістю антитіл. Кількість антигену в тестованому зразку обернено пропорційно кількості стандарту, яке стає пов'язаним з антитілами. Щоб полегшити визначення кількості стандарту, який стає зв'язаним, антитіла зазвичай нерозчинні до або після конкуренції, так що стандарт і аналіз, який зв'язується з антитілами, можуть бути зручно відокремлені від стандарту, і проаналізовані, ті які залишаються непов'язаними.

Сендвіч-аналізи включають використання двох антитіл, кожне з яких здатне зв'язуватися з іншою імуногенною частиною або епітопом білка, який повинно бути виявлено. У сендвіч-аналізі тестований зразок речовини, яка аналізується, зв'язується першим антитілом, яке іміобілізують на твердій основі, і після цього друге антитіло зв'язується з речовиною, яка аналізується, утворюючи, таким чином, нерозчинний комплекс з трьох частин. Див., наприклад, патент США № 4376110. Друге антитіло саме може бути помічено детектуємою частиною (прямим сендвіч-аналізом) або може бути виміряно з використанням антитіла проти імуноглобуліну, яке позначено детектуємою частиною (непрямий сендвіч-аналіз). Наприклад, один тип сендвіч-аналізу являє собою аналіз ІФА, і в цьому випадку частина, що детектується являє собою фермент.

Для імуногістохімії зразок пухлини може бути свіжим або замороженим або може бути заключено в парафін і зафіксований консервантом, наприклад, таким як формалін.

Антитіла також можуть бути використані для діагностичних тестів *in vivo*. Як правило, антитіло мітиться радіонуклідом (таким як ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P або ^{35}S) або барвником, так що пухлина може бути локалізована з використанням імуносцинтиграфії.

F. Діагностичні набори

З метою зручності антитіло даного винаходу може бути надано в наборі, тобто упакованої комбінації реагентів в заздалегідь визначених кількостях з інструкціями для проведення діагностичного аналізу. Якщо антитіло позначено ферментом, в набір входять субстрати і кофактори, необхідні ферментом (наприклад, попередник субстрату, який забезпечує хромофор або флуорофор, що детектуються). Крім того, можуть бути включені інші добавки, такі як стабілізатори, буфери (наприклад, блок-буфер або буфер для лізису) тощо. Відносні кількості різних реагентів можуть широко варіюватися, щоб забезпечити концентрації в розчині реагентів, які суттєво оптимізують чутливість аналізу. Зокрема, реагенти можуть бути представлені у вигляді сухих порошоків, зазвичай ліофілізованих, включаючи наповнювачі, які при розчиненні забезпечують розчин реагенту, який має відповідну концентрацію.

G. Фармацевтичні складки

Фармацевтичні складки антитіла проти VEGF, як описано в цьому документі, або кон'югат антитіла, злитий білок або його полімерний склад, отримують шляхом змішування такого антитіла, що має бажану ступінь чистоти, з одним або більше необов'язковими, фармацевтично прийнятними носіями (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е видання, Osol, A. Ed.(1980)) у формі ліофілізованих складів або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії, як правило, нетоксичні для реципієнтів при використовуваних дозах і концентраціях і включають, але не обмежуються ними: буфери, такі як фосфат, цитрат і інші органічні кислоти; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензіламонійхлорид, хлорид гексаметонію, хлорид бензалконію, хлорид бензетонію, фенол, бутіл або бензиловий спирт, алкілпарабени, такі як метил або пропілпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол і м-крезол); низькомолекулярні (менш ніж близько 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як ЕДТК; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі протиіони, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, Zn-білкові комплекси); і/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як поліетиленгліколь (ПЕГ). Приклади фармацевтично прийнятних носіїв в цьому документі також включають інстерстиціальні лікарські дисперсійні агенти, такі як розчинні нейтрально-активні гіалуронідази, такі як rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Деякі ілюстративні sHASEGP і способи використання, включаючи rHuPH20, описані в публікаціях патенту США № 2005/0260186 і 2006/0104968. В одному з аспектів sHASEGP об'єднують з одним або більше додатковими глікозаміногліканазами, наприклад, хондроїтіназами.

Типові ліофілізовані складки антитіл описані в патенті США № 6267958. Водні складки антитіл включають композиції, описані в патентах США № 6171586 і WO2006 / 044908, причому останні складки включають гістидин-ацетатний буфер.

Склад цього винаходу також може містити більше одного активної сполуки, якщо необхідно для конкретного показання, що піддається лікуванню, переважно тих, які мають додаткові активності, які не чинять несприятливого впливу друг на друга. Наприклад, може бути бажано додатково забезпечити імуносуперсивний агент. Такі молекули відповідним чином присутні в комбінації в кількостях, ефективних для наміченої мети.

Активні інгредієнти можуть бути захоплені в мікрокапсули, отримані, наприклад, методами коацервації або міжфазною полімеризацією, наприклад, гідроксиметилцелюлозою або желатиновими мікрокапсулами і полі-(метилметакрилатними) мікрокапсулами відповідно в колоїдних системах доставки ліків (наприклад, ліпосоми, мікросфери альбуміну, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемульсіях. Такі методи описані в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Складки, використовувані для *in vivo*-введення, зазвичай є стерильними. Стерильність може бути легко досягнута, наприклад, шляхом фільтрації крізь стерильні фільтруючі мембрани.

У деяких варіантах здійснення винаходу, фармацевтичний склад включає одну або більше додаткових сполук. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, обраною з групи, що складається з IL-1 β , IL-6; IL-6R; IL-13; IL-

13R; PDGF; ангіопоетина; ангіопоетина 2; Tie-2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліна; апеліна/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNF-alpha; HTRA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білків, генетично пов'язаних з віковою макулярною дегенерацією (AMD), такі як компоненти комплементу шляху C2, фактор В, фактор Н, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LPC; COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

Наприклад, в деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, біспецифічне антитіло проти VEGF/анти-Ang2, таке як RG-7716 або будь-яке біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, описане в WO 2010/069532 або WO 2016/073157.

В іншому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6, наприклад, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics, див., Наприклад, WO 2016/073890), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, елсилімомаб, герилізмуаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 або їх варіант.

У ще одному додатковому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6R, наприклад, токілізумаб (ACTEMRA®) (див., наприклад, WO 1992/019579), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237 або його варіант.

Н. Терапевтичні способи і композиції

Будь-які антитіла проти VEGF, кон'югати антитіл (наприклад, кон'югати НА, кон'югати ПЕГ і кон'югати пролікарських антитіл), злиті білки і полімерні склади, представлені в цих документах, можуть бути використані в терапевтичних способах.

В одному аспекті забезпечується антитіло проти VEGF для використання в якості лікарського засобу. В іншому аспекті пропонується кон'югат антитіла для використання в якості лікарського засобу. У ще одному аспекті забезпечується злитий білок для використання в якості лікарського засобу. У ще одному аспекті пропонується полімерна композиція для використання в якості лікарського засобу. В інших аспектах винахід забезпечує антитіло проти VEGF для використання при лікуванні розладу, пов'язаного з патологічним ангіогенезом. В іншому аспекті винахід забезпечує кон'югат антитіла для використання при лікуванні розладу, пов'язаного з патологічним ангіогенезом. В інших аспектах винахід забезпечує злитий білок для використання при лікуванні розладу, пов'язаного з патологічним ангіогенезом. У деяких варіантах здійснення винаходу, розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, являє собою окулярний розлад або клітинний проліферативний розлад. У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD, суха AMD, проміжна AMD, прогресуюча AMD або географічна атрофія (GA)), дегенерацію жовтої плями, набряк макули, DME (наприклад, фокальний, нецентральний DME або дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (DR) (наприклад, проліферативну DR (PDR), непроліферативну DR (NPDR) або висотну DR), інші пов'язані з ішемією ретинопатії, ROP, оклюзію вени сітківки (RVO) (наприклад, центральну (CRVO) і розгалужену (BRVO) форми), CNV (наприклад, міопічну CNV), неоваскуляризацію рогівки, захворювання, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, захворювання, пов'язані з ретинальною/ хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічну короткозорість, хворобу фон Хіппель-Ліндау, гістоплазмоз ока, FEVR, хвороба Коутса, хвороба Норрі, OPPG, субкон'юнктивальний крововилив, рубець, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярне глаукому, пігментний ретиніт (RP), гіпертонічну ретинопатію, ангіоматозну проліферацію сітківки, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію зіниці, внутрішньоочну неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, цистодний макулярний набряк (CME), васкуліт, папілломеду, ретиніт, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт, амавроз Лебера, увеїт (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, багатофокальний хоріоїдит), очний гістоплазмоз, блефарит, сухість очей, травматичне пошкодження очей, хвороба Шегрена. У деяких випадках клітинний проліферативний розлад являє собою рак. У деяких випадках, рак являє собою рак молочної залози, рак товстої кишки, недрібноклітинний рак легені, неходжкінську лімфому (НХЛ), рак нирки, рак передміхурової залози, рак печінки, рак голови та шиї, меланому, рак яєчників, мезотеліому або множинну мієлому. В іншому аспекті пропонується анти-VEGF антитіло для використання при лікуванні розладу, пов'язаного з небажаною проникністю судин. У деяких випадках, розлад, пов'язаний з небажаною проникністю судин, є набряком, пов'язаним з пухлинами головного мозку, асцитом, асоційованим із злоякісними новоутвореннями,

синдромом Мейга, запаленням легенів, нефротичним синдромом, перикардіальним випотом, плевральним випотом, або проникністю, пов'язаною з серцево-судинними захворюваннями.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти VEGF для використання в способі лікування. В іншому аспекті пропонується кон'югат антитіла для використання в способі лікування. У ще

5 одному аспекті забезпечується злитий білок для використання в способі лікування. У ще одному аспекті пропонується полімерна композиція для використання в способі лікування. У деяких випадках винахід забезпечує антитіло проти VEGF для використання в способі лікування суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, що включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла проти VEGF. Винахід також забезпечує кон'югат

10 антитіла для використання в способі лікування суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, що включає введення індивідууму ефективної кількості кон'югату антитіла. Винахід також забезпечує злитий білок для використання в способі лікування суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, що включає введення індивідууму ефективної кількості злитого білка. Винахід також забезпечує полімерний склад для

15 використання в способі лікування суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, що включає введення індивідууму ефективної кількості полімерного складу. У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD, суха AMD, проміжна AMD, прогресуюча AMD або географічна атрофія (GA)), дегенерацію жовтої плями, набряк макули, DME (наприклад, фокальний, нецентральний DME або дифузний, пов'язаний з

20 центром DME), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (DR) (наприклад, проліферативну DR (PDR), непроліферативну DR (NPDR) або висотну DR), інші пов'язані з ішемією ретинопатії, ROP, оклюзію вени сітківки (RVO) (наприклад, центральну (CRVO) і розгалужену (BRVO) форми), CNV (наприклад, міопічну CNV), неоваскуляризацію рогівки, захворювання, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, захворювання, пов'язані з ретинальною/ хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічну короткозорість, хворобу фон

25 Хиппель-Ліндау, гістоплазмоз ока, FEVR, хвороба Коутса, хвороба Норрі, OPPG, субкон'юнктивальний крововилив, рубець, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярне глаукому, пігментний ретиніт (RP), гіпертонічну ретинопатію, ангиоматозну проліферацію сітківки, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію зіниці, внутрішньоочну

30 неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, цистодійний макулярний набряк (CME), васкуліт, папілломеду, ретиніт, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт, амавроз Лебера, увеїт (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, багатофокальний хоріоїдит), очний гістоплазмоз, блефарит, сухість очей, травматичне пошкодження очей, хвороба Шегрена. У деяких випадках клітинний проліферативний розлад являє собою рак. У деяких випадках, рак являє собою рак

35 молочної залози, рак товстої кишки, недрібноклітинний рак легені, неходжкінську лімфому (НХЛ), рак нирки, рак передміхурової залози, рак печінки, рак голови та шиї, меланому, рак яєчників, мезотеліому або множинну мієлому.

В інших випадках винахід забезпечує антитіло проти VEGF для використання в способі лікування індивідуума, що має розлад, пов'язаний з небажаною проникністю судин. У деяких випадках, розлад, пов'язаний з небажаною проникністю судин, є набряком, пов'язаним з пухлинами головного мозку, асцитом, асоційованим із злоякісними новоутвореннями, синдромом Мейга, запаленням легенів, нефротичним синдромом, перикардіальним випотом, плевральним випотом, або проникністю, пов'язаною з серцево-судинними захворюваннями.

45 Будь-яке з попередніх застосувань може додатково включати введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента, наприклад, як описано нижче.

У деяких випадках винахід забезпечує антитіло проти VEGF для використання в зниженні або інгібуванні ангиогенезу у суб'єкта. В іншому аспекті представлений кон'югат антитіла для

50 використання у відновленні або інгібуванні ангиогенезу у суб'єкта. У ще одному аспекті забезпечується злитий білок для використання в зниженні або інгібуванні ангиогенезу у суб'єкта. У ще одному аспекті пропонується полімерний склад для використання в зниженні або інгібуванні ангиогенезу у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення винахід забезпечує антитіло проти VEGF для використання в способі зниження або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, що

55 включає введення індивідууму ефективного анти-VEGF антитіла для зменшення або пригнічення ангиогенезу. Винахід також забезпечує кон'югат антитіла для використання в способі зниження або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, що включає введення індивідууму ефективної кількості кон'югату антитіла. Винахід також забезпечує злитий білок для використання в способі зниження або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, що включає введення індивідууму ефективної кількості злитого білка. Винахід також забезпечує полімерний склад для

60

використання в способі зниження або інгібування ангіогенезу у суб'єкта, що включає введення індивідууму ефективної кількості полімерного складу. В інших випадках винахід забезпечує антитіло проти VEGF для використання в зниженні або інгібуванні проникності судин у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення винахід забезпечує антитіло проти VEGF для використання в

5 зниженні або інгібуванні судинної проникності у суб'єкта, що включає введення індивідууму ефективного анти-VEGF антитіла для зниження або інгібування проникності судин. "Суб'єкт" відповідно до будь-якого з вищевказаних способів використання може бути людиною.

У деяких випадках винахід забезпечує антитіло проти VEGF для використання при лікуванні аутоімунного захворювання у суб'єкта. У деяких випадках аутоімунним розладом є

10 ревматоїдний артрит, анкілозуючий спондилоартрит, псоріатичний артрит і хвороба Крона. Будь-яке з попередніх застосувань може додатково включати введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента, наприклад, як описано нижче.

Винахід відноситься до застосування антитіла проти VEGF при виготовленні або приготуванні

15 лікарського засобу. Винахід також передбачає використання кон'югату антитіла при виготовленні або приготуванні лікарського засобу. Крім того, винахід передбачає використання злитого білка при виготовленні або приготуванні лікарського засобу. Винахід також відноситься до застосування полімерного складу при виготовленні або приготуванні лікарського засобу.

Наприклад, в одному випадку лікарський засіб призначений для лікування розладу, пов'язаного

20 з патологічним ангіогенезом. В іншому випадку лікарський засіб призначений для використання в способі лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангіогенезом, що включає введення суб'єкту, який має розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, ефективна кількість лікарського засобу. У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога

25 AMD, суха AMD, проміжна AMD, прогресуюча AMD або географічна атрофія (GA)), дегенерацію жовтої плями, набряк макули, DME (наприклад, фокальний, нецентральний DME або дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (DR) (наприклад, проліферативну DR (PDR), непроліферативну DR (NPDR) або висотну DR), інші пов'язані з ішемією ретинопатії, ROP, оклюзію вени сітківки (RVO) (наприклад, центральну (CRVO) і розгалужену (BRVO) форми), CNV (наприклад, міопічну CNV), неоваскуляризацію рогівки,

30 захворювання, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, захворювання, пов'язані з ретинальною/ хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічну короткозорість, хворобу фон Хиппель-Ліндау, гістоплазмоз ока, FEVR, хвороба Коутса, хвороба Норрі, OPGG, субкон'юнктивальний крововилив, рубець, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярне глаукому, пігментний ретиніт (RP), гіпертонічну ретинопатію, ангіоматозну

35 проліферацію сітківки, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію зіниці, внутрішньоочну неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, цистодійний макулярний набряк (CME), васкуліт, папілломеду, ретиніт, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний

40 (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт, амавроз Лебера, увеїт (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, багатофокальний хоріоїдит), очний гістоплазмоз, блефарит, сухість очей, травматичне пошкодження очей, хвороба Шегрена. У деяких випадках клітинний проліферативний розлад являє собою рак. У деяких випадках, рак являє собою рак

молочної залози, рак товстої кишки, недрібноклітинний рак легені, неходжкінську лімфому

45 (НХЛ), рак нирки, рак передміхурової залози, рак печінки, рак голови та шиї, меланому, рак яєчників, мезотеліому або множинну мієлому. В іншому випадку лікарський засіб призначений для зниження або інгібування ангіогенезу у суб'єкта. В іншому випадку лікарський засіб

призначений для використання в способі зниження або інгібування ангіогенезу у суб'єкта, що

включає введення суб'єкту кількості, ефективного лікарського засобу для зниження або

інгібування ангіогенезу. У будь-якому з попередніх застосувань медикаментів спосіб може

включати введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового

50 терапевтичного агента, наприклад, як описано нижче.

В іншому випадку лікарський засіб призначений для лікування розладу, пов'язаного з

небажаною судинною проникністю. У деяких випадках, розлад, пов'язаний з небажаною

проникністю судин, є набряком, пов'язаним з пухлинами головного мозку, асцитом,

асоційованим із злоякісними новоутвореннями, синдромом Мейга, запаленням легенів,

55 нефротичним синдромом, перикардіальним випотом, плевральним випотом, або проникністю, пов'язаною з серцево-судинними захворюваннями. В іншому випадку лікарський засіб

призначений для використання в способі лікування розладу, пов'язаного з небажаною судинною

проникністю, що включає введення суб'єкту, який має пов'язаний з небажаною судинною

проникністю розлад, ефективної кількості лікарського засобу. В іншому випадку лікарський засіб

60 призначений для зниження або інгібування проникності судин у суб'єкта. В іншому випадку

лікарський засіб призначений для використання в способі зниження або інгібування проникності судин у суб'єкта, що включає введення суб'єкту кількості, ефективного лікарського засобу для зниження або інгібування ангіогенезу. У будь-якому з попередніх застосувань медикаментів, спосіб може включати введення суб'єкту ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента, наприклад, як описано нижче. "Суб'єкт" відповідно до будь-яких з вищевказаних способів використання може бути людиною.

В іншому випадку лікарський засіб призначений для лікування аутоімунного розладу. У деяких випадках аутоімунним розладом є ревматоїдний артрит, анкілозуючий спондилоартрит, псоріатичний артрит і хвороба Крона. В іншому випадку лікарський засіб призначений для використання в способі лікування аутоімунного захворювання, що включає введення суб'єкту, який має аутоімунний розлад, ефективної кількості лікарського засобу. "Суб'єкт" відповідно до будь-якого з вищевказаних способів використання може бути людиною.

Винахід відноситься до способу лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангіогенезом. В одному варіанті здійснення винаходу, спосіб включає введення індивідууму, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, ефективної кількості антитіла проти VEGF. В іншому прикладі, спосіб включає введення індивідууму, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, ефективної кількості кон'югату антитіла. В іншому прикладі, спосіб включає введення індивідууму, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, ефективної кількості злитого білка. В іншому прикладі, спосіб включає введення індивідууму, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, ефективної кількості полімерного складу. У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD, суха AMD, проміжна AMD, прогресуюча AMD або географічна атрофія (GA)), дегенерацію жовтої плями, набряк макули, DME (наприклад, фокальний, нецентральний DME або дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (DR) (наприклад, проліферативну DR (PDR), непроліферативну DR (NPDR) або висотну DR), інші пов'язані з ішемією ретинопатії, ROP, оклюзію вени сітківки (RVO) (наприклад, центральну (CRVO) і розгалужену (BRVO) форми), CNV (наприклад, міопічну CNV), неоваскуляризацію рогівки, захворювання, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, захворювання, пов'язані з ретинальною/хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічну короткозорість, хворобу фон Хиппель-Ліндау, гістоплазмоз ока, FEVR, хвороба Коутса, хвороба Норрі, OPPG, субкон'юнктивальний крововилив, рубець, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярне глаукому, пігментний ретиніт (RP), гіпертонічну ретинопатію, ангиоматозну проліферацію сітківки, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію зіниці, внутрішньоочну неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, цистодний макулярний набряк (CME), васкуліт, папілломеду, ретиніт, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт, амавроз Лебера, увеїт (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, багатофокальний хоріоїдит), очний гістоплазмоз, блефарит, сухість очей, травматичне пошкодження очей, хвороба Шегрена. У деяких випадках клітинний проліферативний розлад являє собою рак. У деяких випадках, рак являє собою рак молочної залози, рак товстої кишки, недрібноклітинний рак легені, неходжкінську лімфому (НХЛ), рак нирки, рак передміхурової залози, рак печінки, рак голови та шиї, меланому, рак яєчників, мезотеліому або множинну мієлому. В інших випадках спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента, як описано нижче. "Суб'єкт" відповідно до будь-якого з вищевказаних способів може бути людиною.

Винахід відноситься до способу лікування розладу, пов'язаного з небажаною проникністю судин. В одному варіанті здійснення винаходу, спосіб включає введення індивідууму, що має розлад, пов'язаний з небажаною проникністю судин, ефективної кількості антитіла проти VEGF. У деяких випадках, розлад, пов'язаний з небажаною проникністю судин, є набряком, пов'язаним з пухлинами головного мозку, асцитом, асоційованим із злоякісними новоутвореннями, синдромом Мейга, запаленням легенів, нефротичним синдромом, перикардіальним випотом, плевральним випотом, або проникністю, пов'язаною з серцево-судинними захворюваннями. В інших випадках спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента, як описано нижче. "Суб'єкт" відповідно до будь-якого з вищевказаних способів може бути людиною.

Передбачається, що антитіло цього винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок або його полімерний склад можуть використовуватися для лікування ссавця. В одному варіанті здійснення винаходу, антитіло або кон'югат антитіла, злитий білок або його полімерний склад вводять нелюдському ссавцю з метою отримання доклінічних даних, наприклад. Ілюстративні нелюдські ссавці, що підлягають лікуванню, включають нелюдських приматів, собак, кішок,

гризунів (наприклад, мишей і щурів) та інших ссавців, на яких проводяться доклінічні дослідження. Такі ссавці можуть бути встановленими тваринами моделями захворювання, що підлягає лікуванню антитілом, або можуть бути використані для вивчення токсичності або фармакокінетики антитіла, що цікавить. У кожному з цих варіантів здійснення винаходу, дослідження ескалації дози можуть бути виконані у ссавця. Наприклад, антитіло можна вводити хазяїну-гризуна в моделі солідної пухлини. Антитіло або кон'югат антитіла, злитий білок або його полімерний склад можна вводити хазяїну (наприклад, гризуна, наприклад кролику) для окулярних фармакокінетичних досліджень, наприклад, шляхом інтравітреального введення (наприклад, інтравітреальною ін'єкцією) або використовуючи пристрої доставки порт.

У наступному аспекті винахід відноситься до фармацевтичних складів, що містить будь-які антитіла проти VEGF, кон'югати антитіл, злиті білки і/або полімерні склади, представлені в цьому документі, наприклад, для використання в будь-якому з вищевказаних терапевтичних способів. В одному варіанті здійснення винаходу, фармацевтичний склад містить будь-які антитіла проти VEGF, кон'югати антитіл, злиті білки і/або полімерні склади, представлені в цьому документі, і фармацевтично прийнятний носій. В іншому варіанті здійснення винаходу, фармацевтичний склад містить будь-які антитіла проти VEGF, кон'югати антитіл, злиті білки і/або полімерні склади, представлені в цьому документі, і щонайменше один додатковий терапевтичний агент, наприклад, як описано нижче. У деяких варіантах здійснення винаходу, фармацевтичний склад містить одну або більше додаткових сполук. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, обраною з групи, що складається з IL-1 β , IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; ангіопетина; Ang2; Tie-2; S1P; інтегринів $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ і $\alpha5\beta1$; бетацеллюліна; апеліна/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNF-альфа; HTRA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білків, генетично пов'язаних з віковою макулярною дегенерацією (AMD), такі як компоненти комплементу шляху C2, фактора B, фактора H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; інтерлейкін-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. Наприклад, в деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, біспецифічне антитіло проти VEGF/анти-Ang2, таке як RG-7716 або будь-яке біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, описане в WO 2010/069532 або WO 2016/073157, або його варіант) В іншому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6, наприклад, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics, див., Наприклад, WO 2016/073890), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, елсилімомаб, герилімузаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 або їх варіант. У ще одному додатковому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6R, наприклад, токілізумаб (ACTEMRA®) (див., наприклад, WO 1992/019579), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237 або його варіант.

Антитіла винаходу або кон'югати антитіл, злиті білки або їх полімерні склади можуть використовуватися як самостійно, так і в поєднанні з іншими агентами в терапії. Наприклад, антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можуть вводитися спільно з щонайменше одним додатковим терапевтичним агентом. У деяких варіантах здійснення додатковим терапевтичним агентом є інше антитіло, хіміотерапевтичний агент, цитотоксичний агент, антиангіогенний агент, імуносупресивний агент, проліки, цитокін, антагоніст цитокінів, цитотоксична радіотерапія, кортикостероїд, протинабряковий, протипухлинна вакцина, анальгетик, агент, що інгібує ріст, або їх комбінації.

Наприклад, в деяких варіантах здійснення винаходу, будь-який з попередніх способів додатково включає введення одного або більше додаткових сполук. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло проти VEGF, кон'югат антитіла, злитий білок або полімерний склад вводять одночасно з додатковим з'єднанням(ями). У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло проти VEGF, кон'югат антитіла, злитий білок або полімерний склад вводять до або після додаткового з'єднання(нь). У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, обраною з групи, що складається з IL-1 β , IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; ангіопетина; Ang2; Tie-2; S1P; інтегринів $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ і $\alpha5\beta1$; бетацеллюліна; апеліна/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNF-альфа; HTRA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білків, генетично пов'язаних з ризиком AMD, таких як компоненти комплементу шляху C2, фактора B, фактора H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; інтерлейкін-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах здійснення винаходу, відповідно до (або стосовно до) будь-якого з перерахованих вище варіантів здійснення, окулярний розлад

являє собою внутрішньоочне неоваскулярне захворювання, обране з групи, яка складається з проліферативних ретинопатій, хоріоїдальної неоваскуляризації (CNV), пов'язаної з віковою макулярною дегенерацією (AMD), діабетичної і іншої пов'язаної з ішемією ретинопатію, діабетичного макулярного набряку, патологічної короткозорості, хвороби фон Хиппель-Ліндау, гістоплазмоза ока, оклюзії сітківки (RVO), включаючи CRVO і BRVO, неоваскуляризацію рогівки, неоваскуляризацію сітківки і ретинопатії недоношених (ROP). Наприклад, в деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, біспецифічне антитіло проти VEGF/анти-Ang2, таке як RG-7716 або будь-яке біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, описане в WO 2010/069532 або WO 2016/073157, або його варіант. В іншому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6, наприклад, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics, див., Наприклад, WO 2016/073890), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, елсилімомаб, герилізмуаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 або їх варіант. У ще одному додатковому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6R, наприклад, токілізумаб (ACTEMRA®) (див., наприклад, WO 1992/019579), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237 або його варіант.

У деяких випадках антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можуть вводитися в комбінації щонайменше з одним додатковим терапевтичним засобом для лікування окулярного розладу, наприклад окулярного розладу описаного в даному документі (наприклад, AMD (наприклад, волога AMD), DME, DR або RVO). Ілюстративні додаткові терапевтичні агенти для комбінованої терапії для лікування окулярних розладів включають, без обмеження, антиангіогенні агенти, такі як антагоністи VEGF, включаючи, наприклад, анти-VEGF антитіла (наприклад, анти-VEGF Fab LUCENTIS® (Ранібізумаб)), злиті білки розчинного рецептора (наприклад, злитий білок рекомбінантного розчинного рецептора EYLEA® (афліберцепт, також відомий як VEGF Trap Eye, Regeneron/Aventis)), аптамери (наприклад, пегільований аптамер проти VEGF MACUGEN® (пегантаніб натрію, NeXstar Pharmaceuticals/OSI Pharmaceuticals)) і інгібітори тирозинкінази VEGFR (наприклад, 4-(4-бром-2-фтораніліно) -6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси)хіназолін (ZD6474), 4-(4 -фторо-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідін-1-ілпропокси) хіназолін (AZD2171), ваталаніб (PTK787), семаксамібін (SU5416, SUGEN) і SUTENT® (сунітиніб)); Триптофаніл-тPHK-синтетаза (TrpRS); скваламін; RETAANE® (ацетат анекортава для суспензії депо, Alcon, Inc.); проліки комбретастатин A4 (CA4P); MIFEPREX® (міфепристон-ru486); субтенон триамцинолону ацетоніду; інтравітреального кристалічний триамцинолон ацетонід; матричні інгібітори металопротеїнази (наприклад, Пріномастат (AG3340, Pfizer)); фтороцинолон ацетонід (включаючи інтраокулярний імплантат флуоцинолону, системи Bausch & Lomb/Control Delivery); ліномід; інгібітори функції інтегрину β3; ангіостатин і їх комбінації. Ці та інші терапевтичні агенти, які можна вводити в комбінації з антитілом даного винаходу, описані, наприклад, в заявці на патент США № US 2014/0017244, яка повністю включена в цей опис за допомогою посилання.

Інші приклади додаткових терапевтичних агентів, які можуть бути використані в комбінації з антитілом даного винаходу, або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR або RVO), включають, але не обмежуються ними, VISUDYNE® (вертепорфін, світлоактивний лікарський засіб, який зазвичай використовується в поєднанні з фотодинамічною терапією з нетепловим лазером), РК412, Ендовіон (NS 3728, NeuroSearch A/S), нейротрофічні фактори (наприклад, нейротрофічний фактор гліального походження (GDNF) і циліарний нейротрофічний фактор (CNTF)), дилтиазем, дорзоламід, PHOTOTROP®, 9-цис-ретиналь, лікарські засоби для очей (наприклад, інгібітори йодистого фосфонію, ехотіофата або карбоангідрази), веовастат (AE-941, AEterna Laboratories, Inc.), Сірпа-027 (AGF-745, Sima Therapeutics, Inc.), нейротрофіни (в тому числі, в якості прикладу, NT-4/5, Genentech), Cand5 (Acuity Pharmaceuticals), INS-37217 (Inspire Pharmaceuticals), антагоністи інтертину (в тому числі від Jerini AG і Abbott Laboratories), EG-3306 (Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (BioDiem Ltd.), талідомід (як використовується, наприклад, EntreMed, Inc.), кардіотрофін-1 (Genentech), 2-метоксיעстрадіол (Allergan/Oculex), DL-8234 (Toray Industries), NTC-200 (Neurotech), тетратиомолібдат (Мічиганський університет), LYN-002 (Lynkeus Biotech), сполука мікроскопічних водоростей (Aquasearch/Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (Celltech Group plc), ATX-S10 (Hamamatsu Photonics), TGF-бета 2 (Genzyme/Celtrix), інгібітори тирозинкінази (наприклад, від Allergan, SUGEN або Pfizer), NX-278-L (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (OPTIS France SA), нейропротекторні клітини ганглія сітківки (Cogent Neurosciences), похідні N-нітропіпазола (Texas A & M University System), KP-102 (Krenitsky Pharmaceuticals), циклоспорин А, терапевтичні агенти, які використовуються в фотодинамічній терапії (наприклад, VISUDYNE®, рецептор-PDT, Bristol-Myers Squibb, Co.;

порфімер натрію для ін'єкцій з PDT; вертепорфін, QLT Inc.; ротапорфін з PDT, Miravent Medical Technologies; талапорфін з PDT, Nippon Petroleum; і мотексафін лутетіум, Pharmascy, Inc.), антисмислові олігонуклеотиди (включаючи, наприклад, продукти, перевірені Novagali Pharma SA і ISIS-13650, Isis Pharmaceuticals) і їх комбінації.

5 Антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в поєднанні з терапією або хірургічною процедурою для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR або RVO), включаючи, наприклад, лазерну фотокоагуляцію (наприклад, панретинальну фотокоагуляцію (PRP)), лазерну генерацію друзів, операцію з макулярними отворами, операцію макулярної транслокації, мініатюрні телескопи, що
10 імплантуються, ангиографію PHL-руху (також відому як мікролазерна терапія і лікування фідерних судин), протонну променеву терапію, мікростимуляційну терапію, відшарування сітківки і склоподібну хірургію, вдавнення склери, субмакулярну хірургію, транспульлярну термотерапію, терапію фотосистеми I, використання РНК-інтерференції (RNAi), екстракорпоральний реофероз (також відомий як мембранна диференціальна фільтрація і
15 реотерапія), імплантацію мікрочіпів, терапію стовбуровими клітинами, замісну терапію генами, терапію генами рибозима (включаючи генну терапію для елемента відповіді гіпоксії, Oxford Biomedica, Lentipak, Genetix; і генну терапію PDEF, GenVec), трансплантацію фоторецепторів/ретинальних клітин (включаючи епітеліальні клітини сітківки, які трансплантуються, Diacrin, Inc, трансплантацію клітин сітківки, Cell Genesys, Inc.), голковколювання і їх комбінації.

У деяких випадках антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можуть вводитися в комбінації з антиангіогенним засобом для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR, або RVO). Будь-який відповідний антиангіогенний агент може бути використаний в комбінації з антитілом цього винаходу, включаючи, але не
25 обмежуючись ними, ті, які перераховані Carmeliet et al. Nature 407: 249-257, 2000. У деяких варіантах здійснення винаходу, антиангіогенний агент являє собою антагоніст VEGF, включаючи, але не обмежуючись ними, антитіло проти VEGF (наприклад, анти-VEGF Fab LUCENTIS® (Панібізумаб), RTH-258 (раніше ESBA-1008, анти-VEGF фрагмент одноланцюгового антитіла, Novartis) або біспецифічне антитіло проти VEGF (наприклад, біспецифічне антитіло
30 проти VEGF/антиангіопоедин 2, таке як RG-7716, Roche)), злитий білок розчинного рекомбінантного рецептора (наприклад, EYLEA® (афліберцепт)), варіант VEGF, розчинний фрагмент VEGFR, аптамер, здатний блокувати VEGF (наприклад, пегаптаніб) або VEGFR, що нейтралізує антитіло проти VEGFR, інгібітор малих молекул тирозинкінази VEGFR, анти-VEGF DARPIn® (наприклад, абіципар пегол), малі інтерферуючі РНК, які інгібують експресію VEGF або
35 VEGFR, інгібітор тирозинкінази VEGFR (наприклад, 4-(4-бромо-2-фтораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси хіназолін (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідин-1-ілпропоксі) хіназолін (AZD2171), ваталаніб (PTK 787), семаксамініб (SU5416; SUGEN) і SUTENT® (сунітиніб)) і їх комбінації. У деяких випадках біспецифічне антитіло проти VEGF зв'язується з другою біологічною молекулою, включаючи, але не обмежуючись ними, IL-
40 1β; IL-6; IL-6R; PDGF (наприклад, PDGF-BB); ангиопоедин; ангиопоедин 2; Tie-2; S1P; інтегрини αvβ3, αvβ5 і α5β1; бетацеллюлін; апелін/APJ; еритропоєтин; фактор комплементу D; TNF-альфа; HTRA1; рецептор VEGF (наприклад, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR або sVEGFR); рецептор ST-2; і білки, генетично пов'язані з ризиком вікової макулярної дегенерації (AMD), такі як компоненти комплементу шляху C2, фактор В, фактор Н, CFHR3, C3b, C5, C5a і
45 C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; і TNFRSF10A. Наприклад, в деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, біспецифічне антитіло проти VEGF/анти-Ang2, таке як RG-7716 або будь-яке біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, описане в WO 2010/069532 або WO 2016/073157, або його варіант.

50 Інші відповідні антиангіогенні агенти, які можна вводити в комбінації з антитілом даного винаходу, або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR або RVO) включають кортикостероїди, ангиостатичні стероїди, анкортав ацетату, ангиостатин, ендостатин, інгібітори тирозинкінази, інгібітори матричної металопротеїнази (MMP), інсуліноподібний фактор росту-зв'язуючий білок 3
55 (IGFBP3), антагоністи стромально-доставленого фактора (SDF-1) (наприклад, антитіла проти SDF-1), фактор пігментного епітелію (PEDF), гама-секретази, дельта-подібний ліганд 4, антагоністи інтегрини, антагоністи гіпоксія-індуційбельного фактора (HIF)-1α, антагоністи СК2 протеїнкінази, агенти, які інгібують стовбурові клітини (наприклад, ендотеліальна клітина-попередник) на місці неоваскуляризації (наприклад, антитіло проти судинного ендотеліального кадгерина (CD-144) і/або антитіло проти SDF-1) і їх комбінації.

В іншому прикладі в деяких випадках антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в комбінації з агентом, який володіє активністю проти неоваскуляризації для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR або RVO), такого як протизапальний лікарський засіб, ціль інгібітора рапаміцину (mTOR) ссавця (наприклад, рапаміцин, AFINITOR® (еверолімус) і TORISEL® (темсиролімус)), циклоспорин, антагоніст фактора некрозу пухлини (TNF) (наприклад, антитіло проти TNF α або його антигензв'язуючий фрагмент (наприклад, інфліксимаб, адалімумаб, цертолізумаб пегол і голімунаб) або злитий білок розчинного рецептора (наприклад, етанерцепт)), агент анти-комплементу, нестероїдний протизапальний агент (NSAID) або їх комбінації.

У ще одному додатковому прикладі в деяких випадках антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в комбінації з агентом, який є нейропротективним і може потенційно зменшувати прогресування сухої AMD до вологої AMD, такого як клас ліків, які називаються "нейростероїдами", які включають такі препарати, як дегідроепіандростерон (DHEA) (торгові марки: PRASTERA™ і FIDELIN®), дегідроепіандростерона сульфату і прегненолона сульфату.

Будь-який відповідний терапевтичний агент AMD може вводитися в якості додаткового терапевтичного агента в поєднанні з антитілом винаходу або кон'югатом антитіла, злитим білком і/або його полімерним складом для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR, або RVO), включаючи, але не обмежуючись ними, антагоніст VEGF, наприклад анти-VEGF антитіло (наприклад, LUCENTIS® (Ранібізумаб), RTH-258 (раніше ESBA-1008, однокланцюговий анти-VEGF фрагмент антитіла, Novartis) або біспецифічне антитіло проти VEGF (наприклад, біспецифічне антитіло проти VEGF/антиангіопоетин 2, таке як RG-7716, Roche)), розчинний злитий білок рецептора VEGF (наприклад, EYLEA® (афліберцепт)), анти-VEGF DARPIn® (наприклад, абіципар пегол, Molecular Partners AG/Allergan) або анти-VEGF аптамери (наприклад, MACUGEN® (пегаттаніб натрію)); антагоніст тромбоцитарного фактора росту (PDGF), наприклад анти-PDGF антитіло, антитіло проти PDGFR (наприклад, REGN2176-3), пегільований аптамер проти PDGF-BB (наприклад, FOVISTA®, Ophthotech/Novartis), злитий білок розчинного PDGFR-рецептора або подвійний антагоніст PDGF/VEGF (наприклад, інгібітор малих молекул (наприклад, DE-120 (Santen) або X-82 (TyrogeneX)) або біспецифічні анти-PDGF/анти-VEGF антитіла)); VISUDYNE® (вертепорфін) в поєднанні з фотодинамічною терапією; антиоксидант; антагоніст системи комплементу, наприклад антагоніст фактора комплементу C5 (наприклад, інгібітор малих молекул (наприклад, ARC-1905 Ophthotech) або анти-C5-антитіло (наприклад, LFG-316, Novartis), антагоніст пропердина (наприклад, антитіло проти пропердина, наприклад CLG-561, Alcon) або антагоніст фактора комплементу D (наприклад, антитіло проти фактора комплементу D, наприклад, лампалізумаб, Roche)); модифікатор циклу перетворення родопсину (наприклад, гідрохлорид еміксустат); сквуаламін (наприклад, OHR-102; Pharm Pharmaceutical); вітаміни і мінеральні добавки (наприклад, ті, які описані в дослідженні з вивчення захворювань, пов'язаних з віком 1 (AREDS1, цинк і/або антиоксиданти) і в дослідженні 2 (AREDS2, цинк, антиоксиданти, лютетин, зеаксантин і/або омега-3 жирні кислоти)); заснована на клітинах терапія, наприклад, NT-501 (Renexus); PH-05206388 (Pfizer), трансплантація клітин huCNS-SC (StemCells), CNTO-2476 (Janssen), OpRegen (Neuroscience Cell Cellure) або трансплантація клітин MA09-hRPE (Ocata Therapeutics); антагоніст тканинного фактора (наприклад, hI-con1; Iconic Therapeutics); агоніст альфа-адренергічного рецептора (наприклад, бримонідин тартрат); пептидна вакцина (наприклад, S-646240; Shionogi); антагоніст амілоїду бета (наприклад, анти-бета амілоїдне моноклональне антитіло, наприклад GSK-933776); антагоніст S1P (наприклад, анти-S1P антитіло, наприклад, iSONEP™; Lpath Inc); антагоніст ROBO4 (наприклад, антитіло проти ROBO4, наприклад DS-7080a, Daiichi Sankyo); лентівірусний вектор, який експресує ендостатин і ангіостатин (наприклад, RetinoStat); і будь-яку їх комбінацію. У деяких випадках терапевтичні агенти AMD (включаючи будь-який з попередніх терапевтичних агентів AMD) можуть бути спільно складені. Наприклад, анти-PDGFR антитіло REGN2176-3 може бути спільно сформульовано з афліберцептом (EYLEA®). У деяких випадках такий спільний препарат можна вводити в комбінації з антитілом даного винаходу. У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD).

Антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в поєднанні з LUCENTIS® (ранібізумабом) для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR або RVO). LUCENTIS® (Ранібізумаб) можна вводити, наприклад, при 0,3 мг/око або 0,5 мг/око інтравітреальною ін'єкцією, наприклад, кожен місяць. У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD).

Антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в поєднанні з EYLEA® (афліберцепт) для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR або RVO). EYLEA® (афліберцепт) можна вводити, наприклад, в 2 мг/око інтравітреальною ін'єкцією, наприклад, кожні чотири тижні (Q4W) або Q4W протягом перших

5

трьох місяців з подальшими ін'єкціями один раз в два місяці для підтримки. У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD). Антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в поєднанні з MACUGEN® (пегаптаніб натрію) для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR або RVO). MACUGEN® (пегаптаніб натрію) можна вводити,

10

наприклад, в 0,3 мг/око інтравітреальною ін'єкцією кожні шість тижнів. У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD). Антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в поєднанні з VISUDYNE® (вертепорфін) в поєднанні з фотодинамічною терапією для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR або RVO). VISUDYNE® можна

15

вводити, наприклад, шляхом внутрішньовенної інфузії в будь-якій зручній дозі (наприклад, 6 мг/м² площі поверхні тіла) і доставлятися один раз кожні три місяці (наприклад, більше 10 хвилин інфузії). У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD). Антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в комбінації з антагоністом PDGF для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD,

20

DME, DR або RVO). Ілюстративні антагоністи PDGF, які можуть бути використані в комбінації з антитілом даного винаходу, включають антитіло проти PDGF, антитіло проти PDGFR, інгібітор малих молекул (наприклад, сквуаламін), пегільований аптамер проти PDGF-B, такий як FOVISTA® (E10030, Ophthotech/Novartis) або подвійний антагоніст PDGF/VEGF (наприклад, інгібітор малих молекул (наприклад, DE-120 (Santen) або X-82 (TyrogeneX)) або біспецифічне антитіло проти PDGF/анти-VEGF). Наприклад, FOVISTA® можна вводити в якості допоміжної терапії до антитіла по винаходу. FOVISTA® можна вводити в будь-якій зручній дозі, наприклад,

25

від 0,1 мг/око до 2,5 мг/око, наприклад, при 0,3 мг/око або 1,5 мг/око, наприклад, шляхом інтравітреальної ін'єкції, наприклад кожні чотири тижні (Q4W). OHR-102 (офтальмічний розчин кальмаміна лактату, 0,2 %) можна вводити очними краплями, наприклад, два рази на день. OHR-102 можна вводити в комбінації з антагоністами VEGF, такими як LUCENTIS® або EYLEA®. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло даного винаходу можна вводити в комбінації з OHR-102, LUCENTIS® і/або EYLEA®. У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD).

30

Антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в поєднанні з RTH-258 для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR або RVO). RTH-258 можна вводити, наприклад, шляхом інтравітреальної ін'єкції або інфузії в око. Для інтравітреальної ін'єкції RTH-258 можна вводити в будь-якій зручній дозі (наприклад, 3 мг/око або 6 мг/око), наприклад, кожні чотири тижні (Q4W) протягом перших трьох місяців в якості завантаження, після чого кожен ін'єкцію 12 тижнів (Q12W) або кожні вісім тижнів (Q8W) для підтримки. У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD).

35

Антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в поєднанні з абіципар пеголом для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR або RVO). Абіципар пегол можна вводити, наприклад, шляхом інтравітреальної ін'єкції. Абіципар пегол можна вводити в будь-якій зручній дозі (наприклад, 1 мг/око, 2 мг/око, 3 мг/око, 4 мг/око або 4,2 мг/око), наприклад, кожні чотири тижні (Q4W) для перших трьох місяців в якості завантаження, а потім ін'єкція кожні 12 тижнів (Q12W) або кожні вісім тижнів (Q8W) для підтримки. У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD).

45

Будь-який відповідний DME та/або терапевтичний агент DR можна вводити в комбінації з антитілом винаходу або кон'югатом антитіла, злитим білком і/або його полімерним складом для лікування окулярного розладу (наприклад, AMD, DME, DR, або RVO), включаючи, але не обмежуючись ними, антагоніст VEGF (наприклад, LUCENTIS® або EYLEA®), кортикостероїд (наприклад, імплантат кортикостероїдів (наприклад, OZURDEX® (імплантат дексаметазону) або ILUVIEN® (флюоцинолон ацетонід інтравітеральний імплантат)) або кортикостероїд, приготований для введення шляхом інтравітеральної ін'єкції (наприклад, триамцинолон ацетонід)) або їх комбінацій. У деяких випадках окулярний розлад являє собою DME та/або DR. Антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в поєднанні з LUCENTIS® (ранібізумабом) для лікування DME та/або DR (наприклад,

50

55

NPDR або PDR). LUCENTIS® (Ранібізумаб) можна вводити, наприклад, при 0,3 мг/око або 0,5 мг/око інтравітреальною ін'єкцією, наприклад, кожні чотири тижні (Q4W).

Антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в поєднанні з EYLEA® (афліберцепт) для лікування DME та/або DR (наприклад, NPDR або PDR). EYLEA® (афліберцепт) можна вводити, наприклад, в 2 мг/око інтравітреальної ін'єкції, наприклад, кожні чотири тижні (Q4W) або Q4W протягом перших чотирьох місяців з подальшими ін'єкціями один раз кожні вісім тижнів (Q8W) для підтримки.

Антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в поєднанні з OZURDEX® (інтравітреальний імплантат дексаметазону) для лікування DME та/або DR. OZURDEX® можна вводити як інтравітреальний імплантат дексаметазону 0,7 мг, який можна вводити кожні шість місяців.

Антитіло винаходу або кон'югат антитіла, злитий білок і/або його полімерний склад можна вводити в поєднанні з ILUVIEN® (інтравітреальний імплантат дексаметазону) для лікування DME та/або DR. OZURDEX® можна вводити як інтравітреальний імплантат флюоцинолона ацетоніда 0,19 мг, який можна елюювати зі швидкістю 0,25 мкг/день і може діяти до близько 36 місяців.

У деяких випадках режим лікування TAO/PRN або режим лікування TAE можна використовувати для введення терапевтичного агента AMD (наприклад, ранібізумаба або афліберцепта) в комбінації з антитілом винаходу або кон'югатом антитіла, злитим білком і/або полімерним складом. Для режиму TAO/PRN після початкових інтравітреальних ін'єкцій кожні чотири тижні (Q4W) (як правило, протягом близько 3 місяців), суб'єкт контролюється щомісяця або через кожен місяць (або навіть більш тривалі інтервали), при ін'єкціях, що вводяться в разі доведення активності захворювання (наприклад, зниження гостроти зору або рідини на оптичній когерентній томографії (ОКТ)). Для режиму TAE суб'єкт може оброблятися кожні чотири тижні (Q4W) з наступним продовженням інтервалу лікування на фіксоване число тижнів (наприклад, +2 тижні) для кожного наступного відвідування до максимального інтервалу (наприклад, кожні 6 тижнів, кожні 8 тижнів, кожні 10 тижнів або кожні 12 тижнів). Око(очі) можна спостерігати і лікувати при кожному відвідуванні, навіть якщо немає ознак активності хвороби. Якщо макула здається вологою (наприклад, через OCT), інтервал для ін'єкцій може бути скорочений (наприклад, -2 тижні), поки макула знову не стане сухою. У деяких випадках окулярний розлад являє собою AMD (наприклад, волога AMD).

Такі комбіновані терапії, зазначені вище, включають комбіноване введення (де два або більше терапевтичних агентів включені в одні і ті ж або окремі склади) і окреме введення, і в цьому випадку введення антитіла по винаходу може відбуватися до, одночасно і/або в наступне запровадження додаткового терапевтичного агента або агентів. В одному варіанті здійснення винаходу, введення анти-VEGF антитіла, кон'югату антитіл, злитого білка або полімерного складу і введення додаткового терапевтичного агента відбувається протягом близько одного, двох, трьох, чотирьох або п'яти місяців або протягом близько однієї, двох або трьох тижнів або протягом близько одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти або шести днів один від одного. Антитіла, кон'югати антитіл, злиті білки і полімерні склади винаходу можуть також використовуватися в поєднанні з променевою терапією.

Антитіло, кон'югат антитіла, злитий білок або полімерний склад даного винаходу (і будь-який додатковий терапевтичний агент) для профілактики або лікування окулярного захворювання або стану можуть вводитися будь-якими відповідними засобами, включаючи, але не обмежуючись ними, наприклад, окулярну, інтраокулярну і/або інтравітреальну ін'єкцію і/або навколосклеральну ін'єкцію, і/або субтенозну ін'єкцію, і/або суперхороїдальну ін'єкцію, і/або місцеве введення у вигляді очних крапель і/або мазі. Такі антитіла, кон'югати антитіл, злиті білки або полімерні склади винаходу можуть бути доставлені різними способами, наприклад, інтравітреально як пристрій і/або депо, яке забезпечує повільне вивільнення сполуки в склоподібне тіло, включаючи описані в таких посиланнях, як Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Jaffe, Ashton, and Pearson, editors, Taylor & Francis (March 2006). В одному прикладі пристрій може бути у вигляді міні-насоса, і/або матриці, і/або системи пасивної дифузії, і/або інкапсульованих клітин, які вивільняють з'єднання протягом тривалого періоду часу (Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Jaffe, Ashton, and Pearson, editors, Taylor & Francis (March 2006)). Додаткові підходи, які можуть бути використані, описані в розділі К нижче.

Препарати для окулярного, інтраокулярного або інтравітреального введення можуть бути отримані способами і з використанням ексципієнтів, відомих в цій галузі техніки. Важливою особливістю ефективного лікування є правильне проникнення через око. На відміну від захворювань передньої частини ока, коли ліки можуть бути доставлені місцево, захворювання сітківки зазвичай виграють від більш сайт-специфічного підходу. Очні краплі і мазі рідко

проникають в задню частину ока, а гематофтальмічний бар'єр перешкоджає проникненню системно вводимих препаратів в очну тканину. Відповідно, спосіб вибору для доставки ліків для лікування захворювання сітківки, такого як AMD і CNV, зазвичай являє собою пряму інтравітреальну ін'єкцію. Інтравітреальні ін'єкції зазвичай повторюються з інтервалами, які залежать від стану пацієнта, а також від властивостей і періоду напіврозпаду доставленого препарату. Додаткові підходи, які можуть бути використані, описані в розділі К нижче.

Кількість антитіла, його варіант антитіла, кон'югат антитіла, злитий білок або його полімерний склад, який буде ефективний при лікуванні конкретного окулярного розладу або стани, буде залежати від характеру розладу або стану і може бути визначений стандартними клінічними методами. Там, де це можливо, бажано спочатку визначити криву доза-реакція і фармацевтичні композиції винаходу *in vitro*, а потім в корисних модельних системах тварин перед тестуванням на людях.

Додаткові відповідні засоби для введення включають в себе парентеральне, внутрішньолегеневе і інтраназальне і, при бажанні, для місцевого лікування, внутрішньовенне введення. Парентеральні інфузії включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревне або підшкірне введення. Дозування може відбуватися будь-яким підходящим шляхом, наприклад, шляхом ін'єкцій, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, в залежності від того, чи є введення короткочасним або хронічним. У цьому документі розглядаються різні графіки дозування, включаючи, але не обмежуючись ними, одноразове або множинне введення в різні моменти часу, введення болусу і пульсову інфузію. У деяких випадках, антитіло проти VEGF, кон'югат антитіла, злитий білок або полімерний склад винаходу можуть вводитися, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрішньошкірно, черезшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньоочеревно, внутрішньоочагово, інтракраніально, внутрішньосуглобово, внутрішньопростатично, внутрішньоплевраль, інтратрахеально, інтратекально, інтраназально, інтравагінально, інтраректально, місцево, внутрішньопухлинно, внутрішньоочеревно, перитонеально, інтравентрикулярно, підшкірно, субкон'юктив, інтравезикулярно, крізь слизову, інтраперикардіально, внутрішньопуповінно, інтраорбітально, перорально, трансдермально, шляхом інгаляції, шляхом ін'єкції, шляхом імплантації, шляхом інфузії, шляхом безперервної інфузії, локалізованими перфузійними ваннами, які діють на клітини безпосередньо, катетером, промиванням, кремами або ліпідними композиціями.

Для профілактики або лікування захворювання відповідна доза антитіла, кон'югату антитіла, злитого білка або полімерного складу даного винаходу (при використанні окремо або в поєднанні з одним або більше іншими додатковими терапевтичними агентами) буде залежати від типу захворювання, яке необхідно лікувати, типу антитіла, тяжкості і перебігу захворювання, незалежно від того, чи вводиться антитіло в профілактичних або терапевтичних цілях, попередньої терапії, клінічної історії пацієнта і відповіді на антитіло, а також на думку лікуючого лікаря. Антитіло, кон'югат антитіла, злитий білок або полімерний склад відповідним чином вводять пацієнтові в один час або протягом ряду процедур. Залежно від типу і тяжкості захворювання, від близько 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,8 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг або 10 мг/кг) антитіла може бути вихідної дозою для введення пацієнтові, незалежно від, наприклад, за допомогою одного або більше окремих введень або шляхом безперервної інфузії. У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіло використовується від близько 0,01 мг/кг до близько 45 мг/кг, від близько 0,01 мг/кг до близько 40 мг/кг, від близько 0,01 мг/кг до близько 35 мг/кг, від близько 0,01 мг/кг до близько 30 мг/кг, від близько 0,01 мг/кг до близько 25 мг/кг, від близько 0,01 мг/кг до близько 20 мг/кг, від близько 0,01 мг/кг до близько 15 мг/кг, від близько 0,01 мг/кг до близько 10 мг/кг, від близько 0,01 мг/кг до близько 5 мг/кг або від близько 0,01 мг/кг до близько 1 мг/кг. Одна типова добова доза може варіюватися від близько 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше, в залежності від факторів, згаданих вище. При повторних введеннях протягом декількох днів або довше, залежно від стану, лікування, як правило, має підтримуватися до тих пір, поки не відбудеться бажане пригнічення симптомів хвороби.

У деяких варіантах здійснення винаходу, способи можуть додатково включати додаткову терапію. Додатковою терапією можуть бути променева терапія, хірургія, хіміотерапія, генна терапія, ДНК-терапія, вірусна терапія, РНК-терапія, імунотерапія, трансплантація кісткового мозку, нанотерапія, терапія моноклональними антитілами або комбінація вищевикладеного. Додаткова терапія може бути у вигляді ад'ювантної або неоад'ювантної терапії. У деяких варіантах здійснення винаходу, додатковою терапією є введення невеликого молекулярного ферментативного інгібітора або антиметастатичного агента. У деяких варіантах здійснення винаходу, додатковою терапією є введення обмежуючих побічні ефекти агентів (наприклад,

агентів, призначених для зменшення виникнення і/або тяжкості побічних ефектів лікування, таких як агенти проти нудоти і т. д.). У деяких варіантах здійснення винаходу, додатковою терапією є променева терапія. У деяких варіантах здійснення винаходу, додатковою терапією є операція. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова терапія являє собою комбінацію променевої терапії і хірургії. У деяких варіантах здійснення винаходу, додатковою терапією є гамма-опромінення. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова терапія може являти собою окреме введення одного або більше терапевтичних агентів, описаних вище.

Зрозуміло, що будь-який з вищевказаних складів або терапевтичних способів може бути виконаний з використанням імунокон'югата по винаходу замість або на додаток до анти-VEGF антитіла.

Зрозуміло, що будь-яка з вищевказаних композицій або будь-який з терапевтичних способів може бути здійснений з використанням кон'югату антитіла, злитого білка або полімерного складу даного винаходу (наприклад, будь-який описаний в даному документі, наприклад, в розділі K нижче) замість або додатково до анти-VEGF антитіла.

I. Виріб

У ще одному аспекті винаходу запропоновано виріб, що містить матеріали, придатні для лікування, профілактики і/або діагностики розладів, описаних вище. Виріб включає контейнер і етикетку або вкладиш в упаковку, вкладений або пов'язаний з контейнером. Відповідні контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприці, пакети з розчинами для внутрішньовенного введення і т. д. Контейнери можуть бути виготовлені з різних матеріалів, наприклад, скла або пластмаси. Контейнер містить композицію, яка ефективно застосовується при лікуванні, профілактиці та/або діагностиці патологічного стану окремо або в комбінації з іншою композицією, і може мати стерильний вхідний отвір (наприклад, контейнер може являти собою пакет з розчином для внутрішньовенного введення або флакон з пробкою, яку проколюють голкою, для підшкірної ін'єкції). Щонайменше один активний агент в композиції є антитілом відповідно до даного винаходу. На етикетці або на вкладиші в упаковку зазначено, що композиція використовується для лікування обраного патологічного стану. Крім того, виріб може містити (а) перший контейнер з композицією, яка міститься в ньому, який відрізняється тим, що композиція містить антитіло відповідно до даного винаходу; і (b) другий контейнер з композицією, яка міститься в ньому, яка відрізняється тим, що композиція включає додаткове цитотоксичне або інший терапевтичний засіб. Виріб в цьому варіанті здійснення винаходу може додатково містити вкладиш для упаковки, який вказує, що композиції можуть використовуватися для лікування конкретного стану. Альтернативно або додатково виріб може додатково містити другий (або третій) контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWF), натрій-фосфатний буфер, розчин Рінгера та розчин глюкози. Він може також включати інші матеріали, бажані з комерційної та користувальницької точок зору, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

Зрозуміло, що будь-який з цих виробів може включати імунокон'югат по винаходу замість або на додаток до анти-VEGF антитіла.

Зрозуміло, що будь-який із зазначених вище виробів може включати в себе кон'югат антитіла, злитий білок або полімерний склад даного винаходу замість або на додаток до анти-VEGF антитіла.

J. Способи ідентифікації варіантів антитіл і поліпшення антитіл

Винахід відноситься до способів поліпшення антитіл і ідентифікації варіантів антитіл. У деяких випадках способи включають в себе ідентифікацію одного або більше змін амінокислотних залишків, які забезпечують посилене зв'язування антитіла з молекулою-мішенню. У деяких випадках способи включають в себе ідентифікацію одного або більше змін амінокислотних залишків, які забезпечують підвищену стабільність (наприклад, термічну стабільність), функціональну експресію і/або згортання білка антитіла. У деяких випадках винахід відноситься до способів поліпшення афінності зв'язування антитіла з молекулою-мішенню. У деяких випадках винахід відноситься до способів поліпшення стабільності (наприклад, термічної стабільності), функціональної експресії і/або згортання білка антитіла. У деяких випадках винахід забезпечує способи поліпшення афінності зв'язування антитіла з молекулою-мішенню і поліпшення стабільності (наприклад, термічної стабільності) антитіла.

Наприклад, винахід відноситься до способів ідентифікації зміни амінокислотного залишку, яке забезпечує посилене зв'язування антитіла з молекулою-мішенню, який включає один або більше (наприклад, 1, 2 або 3) наступних етапів: (а) забезпечення бібліотеки дисплея, що містить нуклеїнові кислоти, що кодують варіанти антитіла-кандидата, який відрізняється тим, що кожен варіант антитіла-кандидата містить зміну амінокислотного залишку в VH або VL в порівнянні з еталонним антитілом, і причому зміни амінокислотного залишку в кожному

положенні VN або VL присутні в бібліотеці дисплея; (b) сортування бібліотеки дисплея на основі зв'язування варіантів антитіла-кандидата з молекулою-мішенню з утворенням сортованої бібліотеки, причому сортована бібліотека містить варіанти антитіла-кандидата з поліпшеним зв'язуванням з молекулою-мішенню в порівнянні з еталонним антитілом; і (c) порівняння частоти, з якою кожна зміна амінокислотного залишку присутня в бібліотеці дисплея і в сортованій бібліотеці, як визначено за допомогою масового паралельного сіквенування, тим самим визначаючи, чи буде кожна зміна амінокислотного залишку збагачена в сортованій бібліотеці в порівнянні з бібліотекою дисплея в якій зміна амінокислотного залишку ідентифікується як та, що сприяє посиленому зв'язуванню з молекулою-мішенню, якщо вона збагачена в сортованій бібліотеці в порівнянні з бібліотекою дисплея. У деяких випадках спосіб додатково включає в себе ідентифікацію амінокислотного залишку, який забезпечує підвищену стійкість до антитіла, наприклад, як описано нижче.

В іншому прикладі, винахід пропонує способи ідентифікації зміни амінокислотного залишку, який забезпечує підвищену стабільність антитіла, який включає один або більше (наприклад, 1, 2 або 3) наступних етапів: (a) забезпечення бібліотеки дисплея, що містить нуклеїнові кислоти, що кодують варіанти антитіла-кандидата, які відрізняються тим, що кожен варіант антитіла-кандидата містить зміну амінокислотного залишку в VN або VL в порівнянні з еталонним антитілом, і причому зміни амінокислотного залишку в кожному положенні VN або VL присутні в бібліотеці дисплея; (b) сортування бібліотеки дисплея на основі зв'язування варіантів антитіла-кандидата з молекулою-мішенню з утворенням сортованої бібліотеки, причому сортована бібліотека містить варіанти антитіла-кандидата з поліпшеною стабільністю в порівнянні з еталонним антитілом; і (c) порівняння частоти, з якою кожна зміна амінокислотного залишку присутня в бібліотеці дисплея і в сортованій бібліотеці, як визначено за допомогою масового паралельного сіквенування, тим самим визначаючи, чи буде кожна зміна амінокислотного залишку збагачена в сортованій бібліотеці в порівнянні з бібліотекою дисплея в якій зміна амінокислотного залишку ідентифікується як та, що додає підвищену стабільність антитілу, якщо вона збагачена в сортованій бібліотеці в порівнянні з бібліотекою дисплея. У деяких випадках спосіб додатково включає в себе ідентифікацію амінокислотного залишку, який забезпечує посилене зв'язування антитіла з молекулою-мішенню, наприклад, як описано вище.

Будь-який з попередніх способів може додатково включати в себе визначення частоти, з якою кожна зміна амінокислоти присутня в бібліотеці дисплея і сортованій бібліотеці за допомогою послідовного паралельного сіквенування на наступному етапі (b).

У деяких випадках зміна амінокислотного залишку може бути збагачена щонайменше в 2 рази в сортованій бібліотеці в порівнянні з бібліотекою дисплея. Наприклад, зміна амінокислотного залишку може бути збагачена в 1,25 рази, в 1,5 рази, в 2 рази, в 3 рази, в 4 рази, в 5 разів, в 6 раз, в 7 разів, в 8 разів, в 9 раз, в 10 разів, в 11 разів, в 12 разів, в 14 разів, в 16 разів або більше в сортованій бібліотеці в порівнянні з бібліотекою дисплея.

Бібліотека дисплея може включати будь-яку придатну кількість варіантів антитіл, наприклад, від близько 1×10^3 до близько 1×10^{12} або більше (наприклад, близько 1×10^3 , близько 1×10^4 , близько 1×10^5 , близько 1×10^6 , близько 1×10^7 , близько $1,5 \times 10^7$, близько $2,5 \times 10^7$, близько 1×10^8 , близько 5×10^8 , близько 1×10^9 , близько 5×10^9 , близько 1×10^{10} , близько 1×10^{11} близько 1×10^{12} або більше) варіантів антитіл. У деяких варіантах здійснення винаходу, бібліотека дисплея може включати в себе близько 3×10^9 варіантів антитіла. У інших варіантах здійснення винаходу, бібліотека дисплея може включати в себе близько 8×10^8 варіантів антитіла.

У будь-якому з попередніх способів, зміна амінокислотного залишку може бути кодовано будь-яким підходящим набором кодонів. Наприклад, в деяких випадках зміна амінокислотного залишку кодується набором вироджених кодонів. Способи заміщення обраної амінокислоти в матричної нуклеїнової кислоти добре відомі в цій галузі, деякі з яких описані в даному документі. Див. також патент США № 7985840, який включений в цей опис за допомогою посилання у всій його повноті. Наприклад, бібліотеки, описані вище або в розділі "Приклади" нижче, можуть бути створені шляхом заміни амінокислот варіантними амінокислотами з використанням методу Кункеля. Див., наприклад, Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382, 1987.

Зміна амінокислотного залишку може бути кодовані будь-яким підходящим набором кодонів. Безліч кодонів являє собою набір різних нуклеотидних триплетних послідовностей, використовуваних для кодування бажаних амінокислот. Набори кодонів можуть бути представлені з використанням знаків для позначення конкретних нуклеотидів або еквімолярних сумішей нуклеотидів, як показано нижче відповідно до коду IUB.

Коди IUB

G Гуанін

A Аденін

T Тирамін

5 C Цитозин

R (A або G)

Y (C або T)

M (A або C)

K (G або T)

10 S (C або G)

W (A або T)

H (A або C або T)

B (C або G або T)

V (A або C або G)

15 D (A або G або T)

N (A або C або G або T)

Як ілюстративний приклад, в наборі кодонів DVK, D може бути нуклеотидами A або G або T; V може бути A або G або C; i K може бути G або T. Ця безліч кодонів може містити 18 різних кодонів і може кодувати амінокислоти Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly і Cys.

20 Олігонуклеотидні або праймерні набори можуть бути синтезовані з використанням стандартних способів. Набір олігонуклеотидів може бути синтезовано, наприклад, шляхом твердофазного синтезу, що містить послідовності, які представляють всі можливі комбінації нуклеотидних триплетів, що надаються набором кодонів, і які будуть кодувати бажану групу амінокислот. Синтез олігонуклеотидів з обраним нуклеотидним "виродженням" в певних положеннях добре відомий в цій галузі техніки. Такі набори нуклеотидів, що мають певні набори кодонів, можуть бути синтезовані з використанням комерційних синтезаторів нуклеїнових кислот (доступні, наприклад, від Applied Biosystems, Фостер Сіті, Каліфорнія), або можуть бути отримані комерційно (наприклад, з Life Technologies, Роквілль, Меріленд). Отже, набір олігонуклеотидів, синтезованих з конкретним набором кодонів, зазвичай включає в себе безліч олігонуклеотидів з різними послідовностями, відмінності, встановлені набором кодонів в загальній послідовності. Олігонуклеотиди, використовувані відповідно до винаходу, мають послідовності, які допускають гібридизацію з зразком нуклеїнової кислоти з варіабельною ділянкою, а також можуть включати сайти рестрикційних ферментів для цілей клонування.

35 У будь-якому з попередніх способів для кодування змін амінокислотних залишків можна використовувати набір вироджених кодонів. У деяких випадках набір вироджених кодонів являє собою набір NNK або NNS кодонів, де N являє собою A, C, G або T; K являє собою G або T; і S являє собою C або G. В особливих випадках набір вироджених кодонів являє собою набір кодонів NNK.

40 Слід розуміти, що будь-який відповідний спосіб дисплея, відомий в цій галузі техніки або описаний в даному документі, може використовуватися в поєднанні з будь-яким з попередніх способів. Наприклад, способи можуть включати в себе фаговий дисплей, бактеріальний дисплей, дисплей дріжджів, дисплей ссавців, дисплей рибосом і/або дисплей мРНК. У будь-якому з попередніх способів може використовуватися будь-яка відповідна бібліотека дисплея. Наприклад, бібліотека відображення може бути обрана з групи, що складається з бібліотеки фанового дисплея, бібліотеки дисплея бактерій, бібліотеки дисплея дріжджів, бібліотеки дисплея ссавців, бібліотеки дисплея рибосом і бібліотеки дисплея мРНК. У конкретних варіантах здійснення зображення, бібліотека дисплея являє собою бібліотеку фагового дисплея.

50 Злиті поліпептиди варіабельного домену антитіла можуть бути відображені на поверхні клітини, вірусу, фагеміда або інших частинок в різних форматах. Ці формати включають, наприклад, scFv, Fab і багатовалентні форми цих фрагментів. Багатовалентні форми можуть являти собою димер ScFv, Fab або Fab', званий в даному документі (ScFv)₂, Fab₂ і F(ab')₂ відповідно. Способи дисплея злитих поліпептидів, що містять фрагменти антитіл, на поверхні бактеріофага добре відомі в цій галузі, наприклад, як описано в публікації патентної публікації номер WO 92/01047 і в даному документі. Інші патентні публікації, наприклад, WO 92/20791; WO 93/06213; WO 93/11236 і WO 93/19172, описують пов'язані способи. Інші публікації показали ідентифікацію антитіл з штучно перестроєними репертуарами V-гена проти безлічі антигенів, що відображаються на поверхні фага (див., наприклад, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227: 381-388, 1992; і як описано в WO 93/06213 і WO 93/11236).

У будь-якому з попередніх способів бібліотека дисплея може бути відсортована (обрана) і/або скринована, щоб ідентифікувати, наприклад, зв'язування з високою спорідненістю до антигену. Сортування може виконуватися, як описано в цьому документі, або іншими підходами, відомими в цій галузі техніки. Див., наприклад, патент США 7985840. У деяких варіантах здійснення

5 винаходу, сортування може включати в себе контактування бібліотеки дисплея з імобілізованим антигеном (наприклад, молекулою-мішенню або її епітопом). В інших варіантах здійснення винаходу, сортування може включати контактування бібліотеки дисплея з розчинним антигеном. Варіанти антитіл, які були обрані, можуть бути додатково піддані скринінгу, щоб охарактеризувати варіант антитіла з точки зору афінності зв'язування (наприклад, за допомогою

10 SPR), стабільності, згортання, структури (наприклад, за допомогою рентгенівської кристалографії) або інших атрибутів.

Будь-який з попередніх способів може включати в себе масове паралельне сіквенування, наприклад, для визначення частоти зміни з якої амінокислотний залишок з'являється в бібліотеці після сортування (званої сортованою бібліотекою) в порівнянні з частотою зміни з якої амінокислотний залишок з'являється в несортованій бібліотеці. Широкий спектр підходів для

15 масового паралельного сіквенування відомий в цій області техніки, і будь-який відповідний підхід може бути використаний в способах даного винаходу. Див., наприклад, Metzker, Nature Reviews Genetics 11: 31-36, 2010, яка включена в цей опис за допомогою посилання в повному обсязі. Типові підходи включають в себе масивно-паралельне розпізнавальне сіквенування (MPSS), полоні-сіквенування, піросіквенування (454/Roche Diagnostics), іонне напівпровідникове сіквенування, одномолекулярне сіквенування в реальному часі, сіквенування шляхом синтезу, сіквенування шляхом лігування. Комерційно доступні масивні паралельні платформи для сіквенування доступні в Roche Diagnostics і інших компаніях. Сіквенування може бути глибоким сіквенуванням, ультра-глибоким сіквенуванням і/або послідовністю наступного покоління.

20

У будь-якому з попередніх способів, спосіб може включати в себе визначення послідовності щонайменше близько 100 000 зчитувань або більше (наприклад, 100 000 читань, 200 000 читань, 300 000 читань, 400 000 читань, 500 000 читань, 600 000 читань, 700 000 читань, 800 000 читань, 900 000 читання, 1 000 000 читань, 2×10^6 читань, 3×10^6 читань, 4×10^6 читань, 5×10^6 читань, 6×10^6 читань, 7×10^6 читань, 8×10^6 читань, 9×10^6 читань, 10^7 читань, 10^8

25 читань, 10^9 читань або 10^{10} читань або більше). Спосіб може включати сіквенування на будь-якій зручній глибині.

У будь-якому з попередніх способів антитіло може бути моноклональним антитілом. У будь-якому з попередніх способів антитіло може бути антитілом IgG. У будь-якому з попередніх способів антитіло може бути фрагментом антитіла. Фрагмент антитіла може бути обраний з

30 групи, що складається з Fab, scFv, Fv, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ і діатіла. У конкретних випадках фрагмент антитіла являє собою Fab.

У будь-якому з попередніх способів подвійне специфічне антитіло може бути моноклональним антитілом. У будь-якому з попередніх способів, подвійним специфічним антитілом може бути антитіло IgG. У будь-якому з попередніх способів, подвійне специфічне антитіло може бути

35 фрагментом антитіла. Фрагмент антитіла може бути обраний з групи, що складається з Fab, scFv, Fv, Fab'-C, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ і діатіла. У конкретних випадках фрагмент антитіла являє собою Fab.

Будь-який з попередніх способів може додатково включати в себе генерацію антитіла, яке було ідентифіковано за допомогою етапів способу. Описані вище способи можуть бути використані з

40 будь-яким з описаних в даному документі антитіл.

К. Окулярні довгострокові підходи до доставки антитіл проти VEGF

Винахід відноситься до композицій для лікування окулярних розладів, які можуть використовуватися для доставки анти-VEGF антитіл тривалої дії (у тому числі будь-яке антитіло проти VEGF, описане в цьому документі, наприклад G6.31 AARR) в око. Наприклад, винахід

45 забезпечує кон'югати антитіл, які включають антитіло проти VEGF, описане в цьому документі (наприклад, кон'югати Fab або Fab'-C антитіла). Винахід також забезпечує злиті білки (наприклад, злиті білки Fab). В інших аспектах винахід забезпечує склади (наприклад, полімерні склади), які включають антитіло проти VEGF, описане в даному документі. Винахід також відноситься до пристроїв, які можуть бути використані для окулярного введення антитіла проти

50 VEGF, описаного в даному документі. Винахід також відноситься до фармацевтичних композицій, які включають кон'югати антитіл, злиті білки і/або склади (наприклад, полімерні композиції), описані в даному документі. Ці композиції можуть бути використані в будь-якому з описаних в цьому документі терапевтичних способів, наприклад, способи лікування окулярного розладу (наприклад, AMD (наприклад, волога AMD), DME, DR (наприклад, NPDR або PDR) або

55 RVO (наприклад, CRVO або BRVO)).

60

1. Кон'югати антитіл

Винахід забезпечує кон'югати антитіл, які включають антитіло проти VEGF і полімер, ковалентно приєднаний до антитіла. Антитіло проти VEGF може бути ковалентно приєднано до полімеру незворотнім чином або оборотним чином. Може бути використаний будь-який відповідний полімер, включаючи описані в цьому документі або інші, відомі в цій області. Полімер може являти собою гідрофільний полімер або гідрофобний полімер. Слід розуміти, що гідрофільний полімер може бути водорозчинним полімером. Може бути використаний будь-який відповідний гідрофільний полімер, наприклад гідрофільний полімер, описаний в публікації міжнародної патентної заявки № WO 2011/066417 і/або Pelegri-O'Day et al. J. Am. Chem. Soc. 136: 14323-14332, 2014 року, які включені в цей документ за допомогою посилання у всій їх повноті. Ілюстративні необмежуючі гідрофільні полімери, які можуть бути використані, включають гіалуронову кислоту (HA), поліетиленгліколь (ПЕГ, також відомий як полі(етиленгліколь)) (наприклад, ПЕГ з прямим ланцюгом, розгалужений ПЕГ, гребінчастий ПЕГ і дендритний ПЕГ), полі[етиленоксид]-ко-(метиленовий етиленоксид)], полі(полі(етиленгліколь) метиловий ефір метакрилата) (pPEGMA), агарозу, альгінат, карагенан, карбоксиметилцелюлозу, целюлозу, похідні целюлози, хітозан, хондроїтинсульфат, колаген, дерматансульфат, декстран, декстрансульфат, фібрин, фібриноген, фібронектин, фукоїдан, желатин, глікозаміноглікани (GAG), глікополімери, гепарин, сульфат гепарину, сильно розгалужений полісахарид (наприклад, галактозний дендример), кератансульфат, метил-целюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу (HPMC), полі(N-(2-гідроксипропіл) метакриламід) (pHPMA), пектини, похідні пектину, полісульфат пентозану, крохмаль, гідроксietилкрохмаль (ГЕК), стирол, вітронектин, полі(акрилову кислоту), полі(метакрилову кислоту), полі(акриламід), полі(акрилову кислоту), полі(аміни), полі(амінокислоти), полі(карбоксибетаїн) (PCB), поліелектроліти, поли(глутамінову кислоту) (PGA), полі(гліцерин) (PG) (наприклад, лінійний, середньофункціональний, гіперрозгалужений, або лінійний гіперрозгалужений PG), полі(малеїнову кислоту), полі(2-оксазолін) (POZ), полі(2-етил-2-оксазолін, полісіалова кислота (PSA), полістирол, похідні полістиролу (наприклад, заряджені похідні полістиролу), полі(стиролсульфонат-со-PEGMA), полівінілпіролідон (ПВП), полі(N-акрилоїлморфолін) (pNACM) і їх сополімери. У деяких випадках полімер являє собою гідрофобний полімер, наприклад, полі(лакто-со-гліколевою кислоту) (PLGA), полілактид (PLA) і полігліколід (PGA). Полімер може бути біорозкладаним і/або біосумісним.

Як приклад полімер може включати будь-яку придатну кількість мономерів, наприклад, між 2 і близько 1×10^4 мономерів (наприклад, близько 10, близько 50, 100, близько 200, близько 300, близько 400, близько 500, близько 600, близько 700, близько 800, близько 900, близько 1000, близько 2000, близько 3000, близько 4000, близько 5000, близько 6000, близько 7000, близько 8000, близько 9000 або близько 1×10^4 мономерів) або більше. Наприклад, полімер може включати між близько 50 і близько 250 мономерів, близько 50 і близько 500 мономерів, між близько 50 і близько 1000 мономерів, між близько 50 і близько 2000 мономерів, між близько 50 і близько 3000 мономерів, між близько 50 і близько 4000 мономерів, між близько 50 і близько 5000 мономерів, між близько 50 і близько 6000 мономерів, між близько 50 і близько 7000 мономерів, між близько 50 і близько 8000 мономерів, між близько 50 і близько 9000 мономерів, між близько 50 і близько 10000 мономерами, між близько 100 і близько 250 мономерів, близько 100 і близько 500 мономерів, між близько 100 і близько 1000 мономерів, між близько 100 і близько 2000 мономерів, між близько 100 і близько 3000 мономерів, між близько 100 і близько 4000 мономерів, між близько 100 до близько 6000 мономерів, між близько 100 до близько 7000 мономерів, між близько 100 до близько 8000 мономерів, між близько 100 до близько 9000 мономерів, між близько 100 і близько 10000 мономерів, між близько 250 до близько 500 мономерів, між близько 250 до близько 1000 мономерів, між близько 250 до близько 2000 мономерів, між близько 250 до близько 3000 мономерів, між близько 250 до близько 4000 мономерів, між близько 250 і близько 5000 мономерів, між близько 250 до близько 6000 мономерів, між близько 250 до близько 7000 мономерів, між близько 250 до близько 8000 мономерів, між близько 250 до близько 9000 мономерів, між близько 250 до близько 10000 мономерів, між близько 500 до близько 1000 мономерів, між близько 500 і близько 2000 мономерами, між близько 500 і близько 3000 мономерами, між близько 500 і близько 4000 мономерами, між близько 500 і близько 5000 мономерами, між близько 500 і близько 6000 мономерами, між близько 500 і близько 7000 мономерів, між близько 500 і близько 8000 мономерів, між близько 500 і близько 9000 мономерів або між близько 500 і близько 10000 мономерів. У деяких випадках полімер може включати близько 500 мономерів.

[illegible]

200 кДа і близько 250 кДа, між близько 175 кДа і близько 225 кДа, між близько 200 кДа і близько 500 кДа, між близько 200 кДа і близько 450 кДа, між близько 200 кДа і близько 400 кДа, між близько 200 кДа і близько 350 кДа, між близько 200 кДа і близько 300 кДа, між близько 200 кДа і близько 300 кДа, між близько 200 кДа і близько 250 кДа, або між близько 200 кДа і близько 225 кДа).

У деяких випадках полімер НА має молекулярну масу від близько 100 кДа до близько 250 кДа (наприклад, близько 100 кДа, близько 110 кДа, близько 120 кДа, близько 130 кДа, близько 140 кДа, близько 150 кДа, близько 160 кДа, близько 170 кДа, близько 180 кДа, близько 190 кДа, близько 200 кДа, близько 210 кДа, близько 220 кДа, близько 230 кДа, близько 240 кДа або близько 250 кДа). У конкретних випадках полімер НА має молекулярну масу близько 200 кДа. Будь-яка з попередніх молекулярних мас може являти собою середньомасову молекулярну масу (також відому як середньомасова молярна маса).

У деяких випадках будь-який з попередніх НА-полімерів є лінійним, тобто не зшитим.

В інших випадках винахід забезпечує кон'югат антитіла, який включає антитіло проти VEGF (наприклад, антитіло проти VEGF, описане в цьому документі), ковалентно приєднане до ПЕГ-полімеру. Такі кон'югати антитіл іноді згадуються як "кон'югати ПЕГ". Може використовуватися будь-який відповідний полімер ПЕГ. ПЕГ може являти собою розгалужений ПЕГ, зірчастий ПЕГ або гребінчастий ПЕГ. ПЕГ-полімер може бути, наприклад, тетрамером ПЕГ, гексамером ПЕГ або октамером ПЕГ. У деяких випадках кон'югат антитіла включає антитіло проти VEGF (наприклад, антитіло проти VEGF, описане в цьому документі, таке як G6.31 AARR), ковалентно приєднане до ПЕГ-дендримеру. Полімери ПЕГ комерційно доступні, наприклад, від JenKem Technology, Quanta BioDesign, NOF America Corporation і інших виробників.

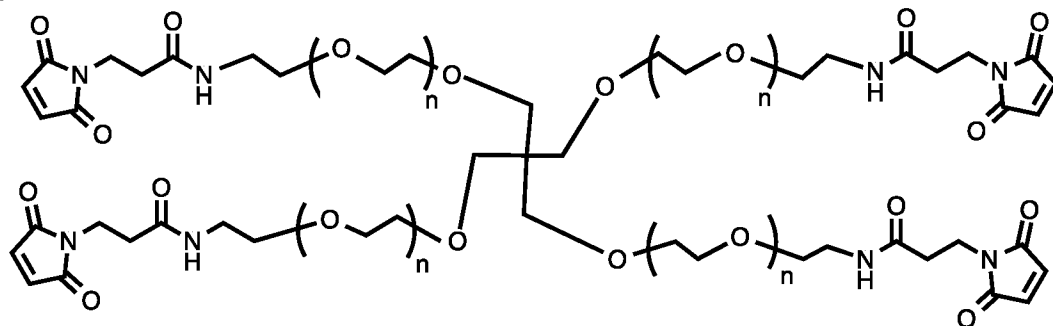
У деяких випадках полімер ПЕГ має молекулярну масу від близько 1 кДа і близько 500 кДа (наприклад, між близько 1 кДа і близько 500 кДа, між близько 1 кДа і близько 450 кДа, між близько 1 кДа і близько 400 кДа, між близько 1 кДа і близько 350 кДа, між близько 1 кДа і близько 300 кДа, між близько 1 кДа і близько 250 кДа, між близько 1 кДа і близько 200 кДа, між близько 1 кДа і близько 150 кДа, між близько 1 кДа і близько 100 кДа, між близько 1 кДа і близько 50 кДа, між близько 10 кДа і близько 500 кДа, між близько 10 кДа і близько 450 кДа, між близько 10 кДа і близько 400 кДа, між близько 10 кДа і близько 350 кДа, між близько 10 кДа і близько 300 кДа, між близько 10 кДа і близько 250 кДа, між близько 10 кДа і близько 200 кДа, між близько 10 кДа і близько 150 кДа, між близько 10 кДа і близько 100 кДа, між близько 10 кДа і близько 50 кДа, між близько 20 кДа і близько 500 кДа, між близько 20 кДа і близько 450 кДа, між близько 20 кДа і близько 400 кДа, між близько 20 кДа і близько 350 кДа, між близько 20 кДа і близько 300 кДа, між близько 20 кДа і близько 250 кДа, між близько 20 кДа і близько 200 кДа, між близько 20 кДа і близько 150 кДа, між близько 20 кДа і близько 100 кДа, між близько 20 кДа і близько 75 кДа, між близько 30 кДа і близько 500 кДа, між близько 30 кДа і близько 450 кДа, між близько 30 кДа і близько 400 кДа, між близько 30 кДа і близько 350 кДа, між близько 30 кДа і близько 300 кДа, між близько 30 кДа і близько 250 кДа, між близько 30 кДа і близько 200 кДа, між близько 30 кДа і близько 150 кДа, між близько 40 кДа і близько 500 кДа, між близько 40 кДа і близько 450 кДа, між близько 40 кДа і близько 400 кДа, між близько 40 кДа і близько 350 кДа, між близько 40 кДа і близько 300 кДа, між близько 40 кДа і близько 250 кДа, між близько 40 кДа і близько 200 кДа, між близько 50 кДа і близько 500 кДа, між близько 50 кДа і близько 450 кДа, між близько 50 кДа і близько 400 кДа, між близько 50 кДа і близько 350 кДа, між близько 50 кДа і близько 300 кДа, між близько 50 кДа і близько 250 кДа, або між близько 50 кДа і близько 225 кДа).

У деяких випадках полімер ПЕГ має молекулярну масу від близько 5 кДа до близько 250 кДа (наприклад, близько 1 кДа, близько 5 кДа, близько 10 кДа, близько 15 кДа, близько 20 кДа, близько 25 кДа, близько 30 кДа, близько 35 кДа, близько 40 кДа, близько 50 кДа, близько 60 кДа, близько 70 кДа, близько 80 кДа, близько 90 кДа, 100 кДа, близько 110 кДа, близько 120 кДа, близько 130 кДа, близько 140 кДа, близько 150 кДа, близько 160 кДа, близько 170 кДа, близько 180 кДа, близько 190 кДа, близько 200 кДа, близько 210 кДа, близько 220 кДа, близько 230 кДа, близько 240 кДа або близько 250 кДа). У конкретних випадках полімер ПЕГ має молекулярну масу близько 20 кДа. В інших випадках полімер ПЕГ має молекулярну масу близько 40 кДа.

Будь-яка з попередніх молекулярних мас може являти собою середньомасову молекулярну масу (також відому як середньомасова молярна маса).

У деяких випадках ПЕГ-полімер являє собою тетрамер ПЕГ. ПЕГ-тетрамери комерційно доступні в, наприклад, NOF America SUNBRIGHT® PTE-400MA, PTE-200MA, PTE-100MA і JenKem Technology USA 4 рукавний ПЕГ малеїмід (кат. № 4ARM-MAL). У деяких випадках

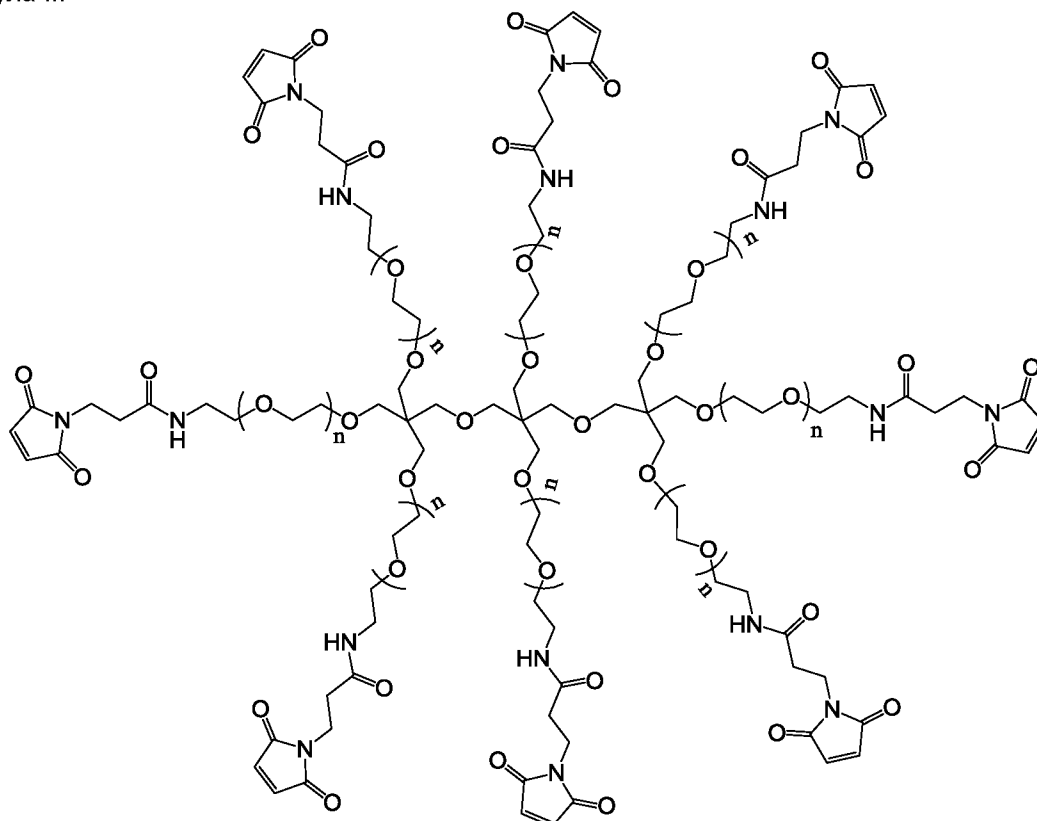
тетрамер ПЕГ має ядро пентаеритритола. Наприклад, в деяких випадках тетрамер ПЕГ включає в себе структуру формули (I), де n незалежно являє будь-яке додатне ціле число:
Формула I:



5 В іншому прикладі, в деяких випадках, ПЕГ-полімер являє собою гексамер ПЕГ. Гексамери ПЕГ є комерційно доступними, наприклад, JenKem Technology USA 6 рукавний ПЕГ амін (кат. № 6ARM (DP)-NH₂HCl) або гексамери ПЕГ з Quanta BioDesign. У деяких випадках гексамер ПЕГ включає ядро дипентилеритритола.

У деяких випадках ПЕГ-полімер являє собою октамер ПЕГ. ПЕГ-октамер є комерційно
10 доступними, наприклад, серія NOF America SUNBRIGHT® HGEO або JenKem Technology USA 8 arm ПЕГ малеїмідом (кат. № 8ARM(TP)-MAL). У деяких випадках октамер ПЕГ може включати ядро трипентаеритритола. Наприклад, в деяких випадках октамер ПЕГ включає в себе структуру формули (II), де n незалежно являє собою будь-яке додатне ціле число:

Формула II:



15 У ще одному прикладі, в деяких випадках, октамер ПЕГ включає в себе трипентаеритритолове ядро.

Слід розуміти, що будь-який відповідний підхід кон'югації, в тому числі описаний в цьому документі, і інші, відомі в цій галузі, можуть бути використані для кон'югації антитіла проти VEGF
20 по винаходу з полімером. Наприклад, полімер може бути кон'югований з будь-якою зручною функціональною групою білка, включаючи первинну аміногрупу, карбоксильну групу, сульфгідрильні групи або карбонільну групу. Будь-яка підходяща хімічно реакційна група може бути використана для націлювання на функціональну групу білка, наприклад, карбодіімід (наприклад, EDC), ефір NHS, імідоефір, пентафторфеніловий ефір, гідроксиметилфосфін,
25 малеїмід, галоацетил (наприклад, бромоеацетил або йодоеацетил), піридилдисульфід,

тіосульфат, вінілсульфон, гідразин, алкоксіамін, діазирин, арилазид, ізоціанат або інші, відомі в даній області. Див., наприклад, Hermanson, Bioconjugate Techniques, 3rd Edition, 2013.

Будь-який з попередніх кон'югатів антитіл може мати гідродинамічний радіус між близько 5 нм і близько 200 нм (наприклад, близько 5 нм, близько 10 нм, близько 20 нм, близько 30 нм, близько 40 нм, близько 50 нм, близько 60 нм, близько 70 нм, близько 80 нм, близько 90 нм, близько 100 нм, близько 110 нм, близько 120 нм, близько 130 нм, близько 140 нм, близько 150 нм, близько 160 нм, близько 170 нм, близько 180 нм, близько 190 нм або близько 200 нм). У деяких випадках кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус між близько 5 нм і близько 150 нм (наприклад, близько 5 нм, близько 10 нм, близько 20 нм, близько 30 нм, близько 40 нм, близько 50 нм, близько 60 нм, близько 70 нм, близько 80 нм, близько 90 нм, близько 100 нм, близько 110 нм, близько 120 нм, близько 130 нм, близько 140 нм або близько 150 нм). У деяких випадках кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус між близько 5 нм і близько 100 нм (наприклад, близько 5 нм, близько 10 нм, близько 20 нм, близько 30 нм, близько 40 нм, близько 50 нм, близько 60 нм, близько 70 нм, близько 80 нм, близько 90 нм або близько 100 нм). У деяких випадках кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус між близько 5 нм і близько 60 нм (наприклад, близько 5 нм, близько 10 нм, близько 20 нм, близько 30 нм, близько 40 нм, близько 50 нм, близько 60 нм). У деяких випадках кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус між близько 25 нм і близько 35 нм (наприклад, близько 25 нм, близько 26 нм, близько 27 нм, близько 28 нм, близько 29 нм, близько 30 нм, близько 31 нм, близько 32 нм, близько 33 нм, близько 34 нм або близько 35 нм). У деяких випадках гідродинамічний радіус становить близько 28 нм.

У деяких випадках кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус між близько 10 нм і близько 200 нм, між близько 10 нм і близько 180 нм, між близько 10 нм і близько 160 нм, між близько 10 і близько 140 нм, між близько 10 нм і близько 120 нм, між близько 10 нм і близько 100 нм, між близько 10 нм і близько 80 нм, між близько 10 нм і близько 60 нм, між близько 10 нм і близько 50 нм, між близько 10 нм і близько 40 нм, між близько 10 нм і близько 30 нм, між близько 20 нм і близько 200 нм, між близько 20 нм і близько 180 нм, між близько 20 нм і близько 160 нм, між близько 20 нм і близько 140 нм, між близько 20 нм і близько 120 нм, між близько 20 нм і близько 100 нм, між близько 20 нм і близько 80 нм, між близько 20 нм і близько 60 нм, між близько 20 нм і близько 50 нм, між близько 20 нм і близько 40 нм, між близько 20 нм і близько 30 нм, між близько 30 нм і близько 200 нм, між близько 30 нм і близько 180 нм, між близько 30 нм і близько 160 нм, між близько 30 нм і близько 140 нм, між близько 30 нм і близько 120 нм, між близько 30 нм і близько 100 нм, між близько 30 нм і близько 80 нм, між близько 30 нм і близько 60 нм, між близько 30 нм і близько 50 нм, між близько 30 нм і близько 40 нм, між близько 40 нм і близько 200 нм, між близько 40 до близько 180 нм, між близько 40 до близько 160 нм, між близько 40 до близько 140 нм, між близько 40 нм і близько 120 нм, між близько 40 нм і близько 100 нм, між близько 40 нм і близько 80 нм, між близько 40 нм і близько 60 нм, між близько 40 нм і близько 50 нм і близько 160 нм, між близько 50 нм і близько 200 нм, між близько 50 нм і близько 180 нм, між близько 50 нм і близько 160 нм, між близько 50 нм і близько 140 нм, між близько 50 нм і близько 120 нм, між близько 50 нм і близько 100 нм, між близько 50 нм і близько 80 нм, між близько 50 нм і близько 60 нм, між близько 60 нм і близько 200 нм, між близько 60 нм і близько 180 нм, між близько 60 нм і близько 160 нм, між близько 60 нм і близько 140 нм, між близько 60 нм і близько 120 нм, між близько 60 нм до близько 100 нм або між близько 60 нм і близько 80 нм.

У деяких випадках кон'югат антитіла являє собою кон'югат антитіл проліків (також званий проліками, пов'язаними з носієм), в якому антитіло проти VEGF (наприклад, антитіло проти VEGF, описане в цьому документі, наприклад, G6.31 AARR) є оборотно кон'югованим з носієм (наприклад, гідрогелем), наприклад, за допомогою лінкера (наприклад, оборотного пролікарського лінкера). Цей підхід описаний далі, наприклад, в публікаціях міжнародної патентної заявки WO 2006/003014, WO 2009/095479, WO 2011/012715, WO 2013/053856 і WO 2014/056923, які включені в цей документ за допомогою посилання у всій їх повноті. Такі проліки кон'югатів антитіл комерційно доступні від Ascendis Pharma (наприклад, технологічної платформи TransCon). Лінкер може мати властиві саморозщеплюючі властивості (наприклад, лінкер може бути не ферментативно гідролізований при введенні в око), що призводить до контрольованого в часі вивільнення антитіла проти VEGF в око (наприклад, склоподібне тіло).

Наприклад, в деяких випадках винахід забезпечує проліки кон'югату антитіла, який включає антитіло проти VEGF (наприклад, антитіло проти VEGF, описане в цьому документі, наприклад, G6.31 AARR), яке ковалентно прикріплюється до носія за допомогою лінкера. У конкретних випадках лінкер являє собою оборотний пролікарський лінкер. У деяких випадках носій включає полімер, наприклад ПЕГ. Наприклад, ПЕГ може бути лінійним, розгалуженим, багаторукавим або дендритним ПЕГ. У деяких випадках носій являє собою гідрогель, що включає біодеградуємий гідрогель. Можна використовувати будь-який відповідний гідрогель, наприклад,

гідрогель на основі ПЕГ. Гідрогель на основі ПЕГ може включати, наприклад, щонайменше 10 % ПЕГ, щонайменше 20 % ПЕГ, щонайменше 30 % ПЕГ або більше. Гідрогель може мати форму кульок мікрочастинок. Такі мікрочастинки можуть мати діаметр від близько 1 мкм до близько 1000 мкм, наприклад, від близько 5 мкм до близько 500 мкм, від близько 10 мкм до близько 100 мкм, від близько 20 мкм до близько 100 мкм або від близько 20 мкм до близько 80 мкм. Діаметри кульок можна виміряти, коли кульки мікрочастинок суспендують у фізіологічному водному буфері. У деяких випадках гідрогель може бути будь-яким гідрогелем, описаним в WO 2006/003014 або WO 2011/012715.

У будь-якому з попередніх кон'югатів антитіла, антитіло може являти собою фрагмент антитіла, який зв'язує VEGF, наприклад, фрагмент антитіла анти-VEGF антитіла, описаного в цьому документі, який пов'язує VEGF. У деяких випадках фрагмент антитіла обирають з групи, що складається з Fab, Fab', Fab'-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂ фрагментів. У конкретних випадках фрагмент антитіла являє собою Fab, Fab' або Fab'-C. У деяких випадках фрагмент антитіла являє собою Fab-C.

Будь-який з попередніх кон'югатів антитіла може мати період окулярного напіввиведення, який збільшений в порівнянні з контрольним антитілом, яке нековалентно пов'язане з полімером (наприклад, гідрофільним полімером). У деяких випадках період окулярного напіввиведення збільшують, щонайменше близько в 2 рази (наприклад, близько в 2 рази, близько в 3 рази, близько в 4 рази, близько в 5 разів, близько в 6 разів, близько в 7 разів, близько в 8 разів, близько в 9 разів, близько в 10 разів, близько в 12 разів, близько в 14 разів, близько в 16 разів, близько в 18 разів, близько в 20 разів або більше) щодо еталонного антитіла. У деяких випадках період окулярного напіввиведення збільшується щонайменше близько в 4 рази відносно еталонного антитіла. У деяких випадках період окулярного напіввиведення являє собою життєвий період життя. У деяких випадках, еталонне антитіло ідентично антитілу кон'югату антитіла. В інших випадках еталонне антитіло не ідентичне антитілу кон'югату антитіла.

Будь-який з попередніх кон'югатів антитіл може мати окулярний кліренс, який зменшується, щодо еталонного антитіла, яке не ковалентно пов'язане з полімером (наприклад, гідрофільним полімером). У деяких випадках кліренс зменшується, щонайменше близько в 2 рази (наприклад, близько в 2 рази, близько в 3 рази, близько в 4 рази, близько в 5 разів, близько в 6 разів, близько в 7 разів, близько в 8 разів, близько в 9 разів, близько в 10 разів, близько в 12 разів, близько в 14 разів, близько в 16 разів, близько в 18 разів, близько в 20 разів або більше) щодо еталонного антитіла. У деяких випадках кліренс зменшується, щонайменше на близько в 4 рази відносно еталонного антитіла. У деяких випадках кліренс являє собою кліренс з склоподібного тіла. У деяких випадках, еталонне антитіло ідентично антитілу кон'югату антитіла. В інших випадках еталонне антитіло не ідентичне антитілу кон'югату антитіла.

У деяких випадках період часу між двома внутрішньоочними введеннями (наприклад, інтравітреальною ін'єкцією) будь-якого з попередніх кон'югатів антитіл (наприклад, кон'югатів НА, кон'югатів ПЕГ і кон'югатів пролікарських антитіл) становить щонайменше 1 місяць, наприклад, щонайменше 1 місяць, по меншій мере 5 тижнів, щонайменше 6 тижнів, щонайменше 7 тижнів, щонайменше 8 тижнів, щонайменше 9 тижнів, щонайменше 10 тижнів, щонайменше 11 тижнів, щонайменше 12 тижнів, щонайменше 13 тижнів, щонайменше 14 тижнів, щонайменше 15 тижнів, щонайменше 16 тижнів, щонайменше 20 тижнів, щонайменше 24 тижні, щонайменше 28 тижнів, щонайменше 32 тижні, щонайменше 36 тижнів, щонайменше 40 тижнів, щонайменше 44 тижні, щонайменше 48 тижнів, щонайменше 52 тижнів або більше. У деяких випадках максимальний період між двома внутрішньоочними введеннями триває не більше чотирьох років, наприклад, не довше ніж три роки, не довше ніж два роки або довше ніж один рік. Кон'югат антитіла можна вводити, наприклад, кожні два-дванадцять місяців, наприклад кожні чотири-десять місяців. У деяких випадках кон'югат антитіла вводять кожні шість місяців.

Винахід також забезпечує композиції (наприклад, фармацевтичні композиції), які включають будь-які кон'югати антитіл, описані вище (наприклад, кон'югати НА, кон'югати ПЕГ і кон'югати пролікарських антитіл). У деяких варіантах здійснення винаходу, композиція містить одне або більше додаткових сполук. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, обраною з групи, що складається з IL-1 β , IL-6; IL-6R; PDGF; ангіопетина; ангіопетина 2; Tie-2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліна; апеліна/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNF-альфа; HTRA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білків, генетично пов'язаних з віковою макулярною дегенерацією (AMD), такі як компоненти комплементу шляху C2, фактора B, фактор H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; інтерлейкіну (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LPC; COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. Наприклад, в деяких

випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, біспецифічне антитіло проти VEGF/анти-Ang2, таке як RG-7716 або будь-яке біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, описане в WO 2010/069532 або WO 2016/073157, або його варіант) В іншому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6, наприклад, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics, див., Наприклад, WO 2016/073890), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирікумаб, елсилімомаб, герилізмумаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 або їх варіант. У ще одному додатковому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6R, наприклад, токілізумаб (ACTEMRA®) (див., наприклад, WO 1992/019579), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237 або його варіант.

Винахід також пропонує композиції (наприклад, фармацевтичні композиції), які включають будь-які кон'югати антитіл, описані вище (наприклад, кон'югати НА, кон'югати ПЕГ і кон'югати пролікарських антитіл) і додатковий антагоніст VEGF.

2. Злиті білки

Винахід забезпечує злиті білки, які включають антитіло проти VEGF (наприклад, будь-який антитіло проти VEGF, описане в цьому документі, наприклад, G6.31 AARR) і окулярної-зв'язуючий домен. Окулярний зв'язує домен може зв'язуватися, наприклад, з біологічною речовиною, що знаходиться в оці (наприклад, рогівкою, склоподібним тілом, сітківкою, епітелієм сітківки або судинної оболонки), що може збільшити час утримання в оці (наприклад, вітреального) (наприклад, шляхом збільшення періоду напіввиведення і/або зменшення кліренсу) антитіла. Окулярний зв'язуючий домен може зв'язуватися з будь-яким підходящою біологічною речовиною, включаючи, наприклад, компонент позаклітинного матриксу. Наприклад, відповідні біологічні речовини в оці (наприклад, склоподібне тіло) можуть включати позаклітинний матричний компонент, такий як вуглевод (наприклад, заряджений вуглевод (наприклад, глікозаміноглікан)), глікопротеїн (наприклад, фібрилін і оптіцин) і білок (наприклад, колаген (наприклад, типи колагену I-XXVII, зокрема колаген II, колаген IX, колаген V, колаген VI, колаген XI і гетеротипічні фібрили колагену) або інші компоненти позаклітинного матриксу, описані, наприклад, в Le Goff et al., Eye 22: 1214-1222, 2008. У деяких випадках компонент позаклітинного матриксу являє собою глікозаміноглікан, наприклад, гіалуронову кислоту (НА) або протеоглікан (наприклад, хондроїтинсульфат або сульфат гепарину). У конкретних випадках глікозаміноглікан являє собою НА. Зв'язуючі НА домени, а також злиті білки, які включають НА-зв'язуючі домени, описані, наприклад, в Park et al., Molecular Pharmaceutics 6 (3): 801-812, 2009; Патенти США № 5986052, 7183377, 7723472 та 8846034; публікація патентної заявки США № 2004/005277; і міжнародної патентної заявки № WO 1998/052590, WO 2010/045506, WO 2014/099997, WO 2015/198243, WO 2015/110809, які включені в цей документ шляхом посилання в усій їхній повноті. Окулярний зв'язуючий домен може бути ковалентно приєднаний до антитілу, наприклад, за допомогою рекомбінантно-злитого з антитілом проти VEGF. В інших випадках окулярний зв'язуючий домен може бути ковалентно кон'юговано або нековалентно кон'юговано (наприклад, за допомогою зв'язування біотин-стрепавідин) з антитілом проти VEGF. Наприклад, винахід забезпечує злитий білок, який включає антитіло проти VEGF (наприклад, будь-яке антитіло проти VEGF, описане в цьому документ, таке як G6.31 AARR), ковалентно приєднано до НА-зв'язуючому домену. У деяких випадках НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до важкого ланцюга або легкого ланцюга антитіла. Наприклад, НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до важкого ланцюга. В іншому прикладі зв'язує домен НА ковалентно приєднаний до легкого ланцюга. НА-зв'язуючий домен може бути ковалентно приєднаний до анти-VEGF антитіла в будь-якому зручному місці, наприклад N-кінці, C-кінці або внутрішньому сайті (наприклад, вставці). НА-зв'язуючий домен може ковалентно приєднуватися до C-кінця важкого ланцюга або до C-кінця легкого ланцюга. Наприклад, в деяких випадках НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до C-кінця важкого ланцюга. В інших випадках НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до C-кінця легкого ланцюга.

У будь-якому з попередніх злитих білків, злитий білок може додатково включати лінкер, причому лінкер розташований між антитілом і НА-зв'язуючим доменом. Будь-який відповідний лінкер може бути використаний, наприклад, $(\text{Gly}_n\text{-Ser}_n)_n$ або $(\text{Ser}_n\text{-Gly}_n)_n$ -лінкер, де n незалежно являє собою ціле число, що дорівнює або більше ніж 1 (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 і більше). У WO 2014/099997 описується ряд лінкерів, кожний з яких може бути використаний в злитих білках даного винаходу. У деяких випадках, лінкер може включати амінокислотну послідовність GGGGS (SEQ ID NO: 61). У деяких випадках, лінкер може складатися з амінокислотної послідовності GGGGS (SEQ ID NO: 61). Інші відповідні лінкери включають $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$, $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ тощо. У деяких випадках, серин можна замінити аланіном (наприклад, (Gly_4Ala) або (Gly_3Ala)).

У будь-якому з попередніх злитих білків, антитіло може являти собою фрагмент антитіла, який зв'язує VEGF. У деяких випадках фрагмент антитіла обирають з групи, що складається з Fab, Fab', Fab'-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂ фрагментів. Наприклад, в деяких випадках фрагмент антитіла являє собою Fab, Fab' або Fab'-C. У деяких випадках HA-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до С-кінця CH1 домену Fab. В інших випадках, HA-зв'язуючий білок ковалентно приєднаний до С-кінця CL домену Fab.

У будь-якому з попередніх злитих білків HA-зв'язуючий домен може бути обраний з групи, що складається з модуля зв'язку, домену G1, багатого на лізин олігопептида і інших зв'язуючих HA доменів, відомих в цій галузі. Наприклад, HA-зв'язуючий домен може являти собою будь-який зв'язуючий HA домен, описаний в Park et al., *Molecular Pharmaceutics* 6 (3): 801-812, 2009; Патенти США № 5986052, 7183377, 7723472 та 8846034; Публікація патентної заявки США № 2004/005277; і/або міжнародної патентної заявки № WO 1998/052590, WO 2010/045506, WO 2014/099997, WO 2015/198243, WO 2015/110809. Наприклад, HA-зв'язуючий домен може бути HA10, HA10.1, HA10.2, HA11 або HA11.1, як описано в WO 2014/099997.

У деяких випадках, HA-зв'язуючий домен є модулем зв'язку. Може використовуватися будь-який відповідний модуль зв'язку. Наприклад, в деяких випадках модуль зв'язку обирають з групи, що складається з TSG6, CD44, рецептора 1 гіалуронової кислоти ендотелію лімфатичних судин (LYVE-1), білка, який зв'язує гіалуронову кислоту і протеоглікан (HAPLN) 1, HAPLN2, HAPLN3, HAPLN4, агрекана, бревікана, нейрокана, фосфакана, версікана, CAB61358, KIA0527, стабіліна-1 і стабіліна-2 або їх варіантів. У деяких випадках модуль зв'язку є модулем зв'язку TSG6, наприклад, людським TSG6-модулем зв'язку. У деяких випадках, модуль зв'язку HA-зв'язуючого білка TSG6 може включати амінокислотні залишки 36-128 TSG6 людини (UniProt № доступу P98066).

Будь-який з попередніх злитих білків може додатково включати щонайменше один додатковий HA-зв'язуючий домен. Наприклад, злитий білок може додатково включати щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 додаткових HA-зв'язуючих доменів (домену). У деяких випадках, щонайменше один додатковий HA-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до важкого ланцюга або легкого ланцюга антитіла. Наприклад, в деяких випадках щонайменше один додатковий HA-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до важкого ланцюга антитіла. В інших випадках, щонайменше один додатковий HA-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до легкого ланцюга антитіла. У деяких випадках, щонайменше один додатковий HA-зв'язуючий білок з'єднаний з антитілом лінкером. Може використовуватися будь-який відповідний лінкер, такий як лінкер, описаний вище. У деяких випадках лінкер включає амінокислотну послідовність GGGGS (SEQ ID NO: 61). У деяких випадках, лінкер складається з амінокислотної послідовності GGGGS (SEQ ID NO: 61). У деяких випадках, перший HA-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до важкого ланцюга, а другий HA-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до легкого ланцюга. Щонайменше, один додатковий HA-зв'язуючий домен може бути ковалентно приєднаний до анти-VEGF антитіла в будь-якому зручному місці, наприклад N-кінці, С-кінці або внутрішньому сайті (наприклад, вставці). У тих випадках, коли антитіло включає в себе більш ніж один додатковий HA-зв'язуючий домен в антитілі, вставки можуть перебувати в одному сайті в антитілі або в декількох різних сайтах в антитілі. Наприклад, в деяких випадках, перший HA-зв'язуючий домен з'єднаний з С-кінцем важкого ланцюга, а другий HA-зв'язуючий домен з'єднаний з С-кінцем легкого ланцюга. У деяких випадках, щонайменше один додатковий HA-зв'язуючий білок обирають з групи, що складається з модуля зв'язку, домену G1 і багатого на лізин олігопептида. Наприклад, в деяких випадках, щонайменше один додатковий HA-зв'язуючий білок являє собою модуль зв'язку. Модуль зв'язку може бути будь-яким модулем зв'язку, описаним в цьому документі або відомим в цій галузі. У деяких випадках модуль зв'язку є модулем зв'язку TSG6, наприклад, людським TSG6-модулем зв'язку. У деяких випадках, модуль зв'язку HA-зв'язуючого білка TSG6 може включати амінокислотні залишки 36-128 TSG6 людини (UniProt № доступу P98066).

Будь-який з попередніх злитих білків може специфічно зв'язуватися з VEGF і HA. У деяких випадках злитий білок зв'язує HA з Kd близько 10 мкМ або нижче. Наприклад, в деяких випадках злитий білок зв'язує HA з Kd близько 10 мкМ або нижче, 8 мкМ або нижче, 6 мкМ або нижче, 4 мкМ або нижче, 2 мкМ або нижче, 1 мкМ або нижче, 750 нМ або нижче, 500 нМ або нижче, 250 нМ або нижче, 100 нМ або нижче, 50 нМ або нижче, 10 нМ або нижче або 1 нМ або нижче. У деяких випадках злитий білок зв'язує HA з Kd близько 2 нМ або нижче. У деяких випадках злитий білок зв'язує HA з Kd між близько 1 нМ і близько 2 мкМ, наприклад, між близько 1 нМ і близько 1,8 мкМ, між близько 1 нМ і близько 1,6 мкМ, між близько 1 нМ і близько 1,4 мкМ, між близько 1 нМ і близько 1,2 мкМ, між близько 1 нМ і близько 1,0 мкМ, між близько 1 нМ і близько 900 нМ, між близько 1 нМ і близько 800 нМ, між близько 1 нМ і близько 700 нМ, між близько 1

нМ і близько 600 нМ, між близько 1 нМ і близько 500 нМ, між близько 1 нМ і близько 400 нМ, між близько 1 нМ і близько 300 нМ, між близько 1 нМ і близько 200 нМ, між близько 1 нМ і близько 100 нМ, між близько 1 нМ і близько 50 нМ, між близько 1 нМ і близько 40 нМ, між близько 1 нМ і близько 30 нМ, між близько 1 нМ і близько 20 нМ, між близько 1 нМ і близько 10 нМ, між близько 5 нМ і близько 100 нМ, між близько 5 нМ і близько 50 нМ, між близько 5 нМ і близько 25 нМ, між близько 5 нМ і близько 15 нМ або між близько 5 нМ і близько 10 нМ. У деяких випадках злитий білок зв'язує НА з Kd близько 10 нМ.

Будь-який з попередніх злитих білків може мати окулярний період напіввиведення, який збільшений у порівнянні з еталонним антитілом, яке ковалентно приєднано до НА-зв'язуючому домену. У деяких випадках період окулярного напіввиведення збільшують, щонайменше близько в 2 рази (наприклад, близько в 2 рази, близько в 3 рази, близько в 4 рази, близько в 5 разів, близько в 6 разів, близько в 7 разів, близько в 8 разів, близько в 9 разів, близько в 10 разів, близько в 12 разів, близько в 14 разів, близько в 16 разів, близько в 18 разів, близько в 20 разів або більше) щодо еталонного антитіла. У деяких випадках період окулярного напіввиведення збільшується щонайменше близько в 4 рази відносно еталонного антитіла. У деяких випадках період окулярного напіввиведення являє собою вітреальний період напіввиведення. У деяких випадках, еталонне антитіло ідентично антитілу злитого білка. В інших випадках еталонне антитіло не ідентичне антитілу злитого білка.

Будь-який з попередніх злитих білків може мати окулярний кліренс, який зменшується відносно еталонного антитіла, яка не ковалентно приєднано до НА-зв'язуючого домену. У деяких випадках кліренс зменшується, щонайменше близько в 2 рази (наприклад, близько в 2 рази, близько в 3 рази, близько в 4 рази, близько в 5 разів, близько в 6 разів, близько в 7 разів, близько в 8 разів, близько в 9 разів, близько в 10 разів, близько в 12 разів, близько в 14 разів, близько в 16 разів, близько в 18 разів, близько в 20 разів або більше) щодо еталонного антитіла. У деяких випадках кліренс зменшується, щонайменше на близько в 4 рази відносно еталонного антитіла. У деяких випадках кліренс являє собою кліренс з склоподібного тіла. У деяких випадках, еталонне антитіло ідентично антитілу злитого білка. В інших випадках еталонне антитіло не ідентичне антитілу злитого білка.

У деяких випадках період часу між двома внутрішньоочними введеннями (наприклад, інтравітреальною ін'єкцією) будь-якого з попередніх злитих білків становить щонайменше 1 місяць, наприклад, щонайменше 1 місяць, щонайменше 5 тижнів, щонайменше 6 тижнів, щонайменше 7 тижнів, щонайменше 8 тижнів, щонайменше 9 тижнів, щонайменше 10 тижнів, щонайменше 11 тижнів, щонайменше 12 тижнів, щонайменше 13 тижнів, щонайменше 14 тижнів, щонайменше 15 тижнів, щонайменше 16 тижнів, щонайменше 20 тижнів, щонайменше 24 тижні, щонайменше 28 тижнів, щонайменше 32 тижні, щонайменше 36 тижнів, щонайменше 40 тижнів, щонайменше 44 тижні, щонайменше 48 тижнів, щонайменше 52 тижні або більше. У деяких випадках максимальний період між двома внутрішньоочними введеннями триває не більше ніж чотири роки, наприклад, не більше ніж три роки, не більше ніж два роки або не більше ніж один рік. Злитий білок можна вводити, наприклад, кожні два-дванадцять місяців, наприклад кожні чотири-десять місяців. У деяких випадках злитий білок вводять кожні шість місяців.

Винахід також відноситься до композицій (наприклад, фармацевтичних композицій), які включають будь-який зі злитих білків, описаних вище. У деяких варіантах здійснення винаходу, композиція містить одне або більше додаткових сполук. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, обраною з групи, що складається з IL-1 β , IL-6; IL-6R; PDGF; ангіопоетина; ангіопоетина 2; Tie-2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліна; апеліна/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNF-альфа; HTRA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білків, генетично пов'язаних з ризиком AMD, такі як компоненти комплементу шляху C2, фактора B, фактора H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LPC; COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. Наприклад, в деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, біспецифічне антитіло проти VEGF/анти-Ang2, таке як RG-7716 або будь-яке біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, описане в WO 2010/069532 або WO 2016/073157, або його варіант) В іншому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6, наприклад, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics, див., Наприклад, WO 2016/073890), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, елсиліумаб, герилімузаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 або їх варіант. У ще одному додатковому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло

проти IL-6R, наприклад, токілізумаб (ACTEMRA®) (див., наприклад, WO 1992/019579), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237 або його варіант.

Винахід також відноситься до композицій (наприклад, фармацевтичних композицій), які включають будь-який зі злитих білків, описаних вище злитих білків і додатковий антагоніст VEGF.

3. Полімерні склади

Винахід відноситься до складів, які включають антитіло проти VEGF по винаходу і полімер. Полімерна композиція може являти собою, наприклад, мікросферу, імплантат, гідрогель, органогель, наноагрегат, міцелу, *in situ* сформоване депо або інший тип полімерної композиції, відомий в цій галузі техніки. Будь-який відповідний полімер може бути використаний в полімерних складах по винаходу. Наприклад, полімер може являти собою гідрофільний полімер або гідрофобний полімер. Слід розуміти, що гідрофільний полімер може бути водорозчинним полімером. Може бути використаний будь-який відповідний гідрофільний полімер, наприклад гідрофільний полімер, описаний в публікації міжнародної патентної заявки № WO 2011/066417 або Pelegri-O'Day et al. J. Am. Chem. Soc. 136:14323-14332, 2014. В інших випадках, наприклад, можуть бути використані гідрофобні полімери. Полімер може бути біорозкладаним і/або біосумісним.

Ілюстративні необмежуючі гідрофільні полімери, які можуть бути використані, включають гіалуронову кислоту (HA), поліетиленгліколь (ПЕГ, також відомий як полі(етиленгліколь)) (наприклад, ПЕГ з прямим ланцюгом, розгалужений ПЕГ, гребінчастий ПЕГ і дендритний ПЕГ), полі(етиленоксид)-ко-(метиленовий етиленоксид)], полі(полі(етиленгліколь) метиловий ефір метакрилата) (pPEGMA), агарозу, альгінат, карагенан, карбоксиметилцелюлозу, целюлозу, похідні целюлози, хітозан, хондроїтинсульфат, колаген, дерматансульфат, декстран, декстрансульфат, фібрин, фібриноген, фібронектин, фукоїдан, желатин, глікозаміноглікани (GAG), глікополімери, гепарин, сульфат гепарину, сильно розгалужений полісахарид (наприклад, галактозний дендример), кератансульфат, метил-целюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу (HPMC), полі(N-(2-гідроксипропіл) метакриламід) (pHPMA), пектини, похідні пектину, полісульфат пентозану, крохмаль, гідроксипропілметилцелюлозу (ГЕК), стирол, вітронектин, полі(акрилову кислоту), полі(метакрилову кислоту), полі(акриламід), полі(акрилову кислоту), полі(аміни), полі(амінокислоти), полі(карбоксиметил-β-глюкозамін) (PCB), поліелектроліти, полі(глутамінову кислоту) (PGA), полі(гліцерин) (PG) (наприклад, лінійний, середньофункціональний, гіперрозгалужений, або лінійний гіперрозгалужений PG), полі(малеїнову кислоту), полі(2-оксазолін) (POZ), полі(2-етил-2-оксазолін, полісіалова кислота (PSA), полістирол, похідні полістиролу (наприклад, заряджені похідні полістиролу), полі(стиролсульфонат-со-PEGMA), полівінілпіролідон (ПВП), полі(N-акрилоїлморфолін) (pNACM) і їх сополімери. В інших випадках може бути використаний будь-який відповідний гідрофобний полімер, що включає, наприклад, полі(молочно-ко-гліколевую кислоту) (PLGA), полілактид (PLA) і полігліколід (PGA).

Винахід відноситься до анти-VEGF антитіл, складених у вигляді депо з полімерним розчинником (також відомим як *in situ* сформовані імплантати). Наприклад, депо полімерного розчинника може включати полімер (наприклад, будь-який з описаних в цьому документі полімерів, наприклад гідрофобний полімер, такий як PLGA), розчинник (наприклад, органічний розчинник) і анти-VEGF антитіло (наприклад, будь-яке антитіло проти VEGF, описане в даному документі). Розчинник може мати низьку змішуваність з водою. Приклади органічних розчинників, які можуть бути використані, включають триацетин (ацетат гліцерину), N-метіл-2-піролідон, діетиловий ефір полі(етиленгліколю) і етилбензоат. В одному робочому прикладі, депо полімерного розчинника може бути отримано диспергуванням висушеного розпиленням порошку антитіла проти VEGF (наприклад, будь-якого антитіла проти VEGF, описаного в даному документі, наприклад, G6.31 AARR) в розчині PLGA-триацетина (див., наприклад, Chang et al. J. Pharm. Sci. 104 (10): 3404-17, 2015, який включений в цей опис за допомогою посилання в повному обсязі). PLGA може мати молекулярну масу близько 10 кДа, близько 41 кДа, або близько 56 кДа, наприклад. Полімери PLGA є комерційно доступними, наприклад, RG 752S, RG755S і RG 756S (Evonik Industries, Дармштадт, Німеччина). Концентрація PLGA може становити близько 7,5 %, близько 10 %, близько 12,5 %, близько 15 %, близько 20 % або більше (мас. %). Концентрація антитіла може становити близько 1 %, близько 1,5 %, близько 2 %, близько 2,5 %, близько 3 %, близько 4 %, близько 5 % або більше (% мас.). У деяких випадках концентрація антитіла становить близько 1,5 % (мас. %). Будь-який склад депо полімерних розчинників може бути введений, наприклад, через голку 27 калібру (27G). При введенні (наприклад, шляхом ін'єкції (наприклад, інтравітреальної ін'єкції)) такі склади депо полімерних розчинників можуть перетворюватися в гель або тверде депо в оці. Гель або тверде депо

можуть утворюватися в результаті розшаровування водної і неводної фаз. Залежно частково від швидкості перенесення розчинника в водній фазі, ін'єктоване депо може перейти в твердий матеріал або гель через осадження полімеру і фізично захоплювати анти-VEGF антитіло (і будь-які додаткові терапевтичні агенти або сполуки). В інших випадках, наприклад, поперечне зшивання *in situ* або *in situ*-застигаючі органогелі можуть бути використані для утворення гелю або твердого депо. Депо полімерного розчинника може забезпечити довгострокову доставку, наприклад, протягом близько 30 днів або більше, наприклад, близько 30 днів, близько 40 днів, близько 50 днів, близько 60 днів, близько 70 днів, близько 80 днів, близько 90 днів, близько 100 днів, близько 110 днів, близько 120 днів, близько 130 днів або більше. У деяких випадках депо полімерних розчинників може забезпечити довгострокову доставку протягом близько 80 днів в оці.

Винахід також відноситься до анти-VEGF антитіла (наприклад, до будь-якого анти-VEGF антитіла, описаного в даному документі), складеним у вигляді полімерної міцели. Полімерна міцела може бути утворена, наприклад, шляхом самозбирання полімеру (наприклад, амфіфільного блоку (наприклад, диблочного або багатоблокового) сополімера) в наночастинку, що має гідрофобну серцевину і гідрофільну оболонку. Полімерна міцела може мати будь-який відповідний діаметр (наприклад, середній діаметр), наприклад, діаметр від близько 1 нм до близько 1000 нм (наприклад, близько 1 нм, близько 10 нм, близько 100 нм, близько 200 нм, близько 300 нм, близько 400 нм, близько 500 нм, близько 600 нм, близько 700 нм, близько 800 нм, близько 900 нм, близько 1000 нм) або більше. У деяких випадках полімерна міцела може мати діаметр (наприклад, середній діаметр) від близько 5 нм до близько 100 нм (наприклад, близько 5, близько 10, близько 20, близько 30, близько 40, близько 50, близько 60, близько 70, близько 80, близько 90 або близько 100 нм). Можна використовувати будь-який відповідний полімер, включаючи, наприклад, амфіфільні блок-сopolімери, такі як полі(пропіленоксид) (PPO), полі(D, L-молочна кислота) (PDLLA), полі(ε-капролактон) (PCL), полі(L-аспартат) і полоксамер (наприклад, полі(етиленоксид)-блок-полі(пропіленоксид)-блок-полі(етиленоксид) сополімери (наприклад, PLURONICS®)). Інші амфіфільні блок-сopolімери відомі в цій галузі. У деяких випадках антитіло проти VEGF може бути приєднано до гідрофільної оболонки полімерної міцели, наприклад, шляхом ковалентного приєднання до полімеру. Відповідно, в деяких випадках кон'югат антитіла, описаний вище, може бути використаний для отримання полімерної міцели, яка включає антитіло проти VEGF.

Винахід також відноситься до анти-VEGF антитіла (наприклад, до будь-якого анти-VEGF антитіла, описаного в цьому документі, наприклад, G6.31 AARR), складеному у вигляді полімерного імплантату. Полімерний імплантат являє собою жорсткий об'єкт, в якому твердий лікарський препарат (наприклад, антитіло) рівномірно розподіляється всередині гідрофобного полімеру (наприклад, PLGA). Полімерний імплантат зазвичай має міліметровий розмір (наприклад, 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 1,1 мм, 1,2 мм, 1,3 мм, 1,4 мм, 1,5 мм, 1,6 мм, 1,7 мм, 1,8 мм, 1,9 мм, 2 мм, 2,1 мм, 2,2 мм, 2,3 мм, 2,5 мм, 3 мм, 4 мм, 5 мм, 6 мм, 7 мм, 8 мм, 9 мм, 10 мм, 11 мм, 12 мм, 13 мм, 14 мм, 15 мм, 16 мм, 17 мм, 18 мм, 19 мм, 20 мм або більше). Полімерний імплантат можна вводити в око, наприклад, хірургічною процедурою (наприклад, мікрохірургії) або шляхом ін'єкції (наприклад, шляхом інтравітреальної ін'єкції) з використанням відповідного пристрою. Полімерний імплантат може бути складений для введення в будь-яку відповідну ділянку в оці, наприклад, в склоподібну, передню або задню камери ока або внутрішньоретинальну, субретинальну, інтрахоридну, супрахоріоїдальну, епісклеральну, субкон'юнктивальну, внутрішньокорнеальну або в епікорнеальну ділянки очей. У конкретних випадках полімерний імплантат готують для введення в склоподібне тіло.

Полімерний імплантат, який включає антитіло проти VEGF (наприклад, будь-яке антитіло проти VEGF, описане в даному документі, наприклад G6.31 AARR), може бути отримано з використанням процесу екструзії гарячим розплавом (HME). Теплом впливають на розплав (псевдозрідження) полімеру, а потім механічне зрушення може бути передано для змішування і мікрокомпозиції твердого лікарського складу в фазі рідкого полімеру. Потім суміш лікарського препарату-полімеру може бути екструдована крізь матрицю міліметрового розміру (наприклад, круглу головку). Коли екструдату дають охолонути (наприклад, до кімнатної температури), він утворює стрижні (наприклад, циндрильні стрижні), які можна розрізати на будь-яку бажану довжину. У деяких випадках полімерний імплантат може бути стрижнем PLGA, який включає антитіло проти VEGF і PLGA. Полімерні імплантати, які можуть бути використані в контексті цього винаходу, описані, наприклад, в Rajagopal et al. J. Pharmaceutical Sciences 102 (8): 2655-2666, 2013 і публікації міжнародної патентної заявки № WO 2006/093758, які включені в цей опис за допомогою посилання у всій їх повноті.

В одному робочому прикладі антитіло проти VEGF (наприклад, будь-яке антитіло проти VEGF, описане в цьому документі) може бути отримано у вигляді висушеної розпиленням композиції, яка може включати трегалозу і гістидин-HCl-буфер для стабільності при підвищених температурах, яка може бути додана до гідрофобного полімеру, такого як PLGA, і схильна до

5 НМЕ з утворенням полімерного імплантату (див., наприклад, Rajagopal et al., вище). Наприклад, висушена розпиленням композиція може включати антитіло в будь-якій зручній концентрації (наприклад, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл, 11 мг/мл, 12 мг/мл, 13 мг/мл, 14 мг/мл, 15 мг/мл, 16 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, 30 мг/мл), трегалозу в будь-якій зручній концентрації (наприклад, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 3,3 мг/мл, 4

10 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 10 мг/мл і/або буфер (наприклад, 10 мМ гістидин HCl). Висушений розпиленням склад може мати будь-який відповідний pH, наприклад, pH близько між близько 5 і близько 8 (наприклад, близько 5, близько 6, близько 7 або близько 8). У деяких випадках висушений розпиленням склад може мати pH близько 6 або близько 6,2. В окремих випадках висушений розпиленням склад включає антитіло проти VEGF, 3,3 мг/мл трегалози і 10

15 мМ гістидин-HCl, pH 6,2. Полімерний імплантат може бути отриманий за допомогою НМЕ-висушеного розпиленням складу за допомогою гідрофобного полімеру, такого як PLGA. Наприклад, тверді гранули PLGA і висушений розпиленням склад можна попередньо змішувати при кімнатній температурі і подавати в конічний, протиобертовий двошнековий екструдер. Комбінація може бути мікрокомпонентною, а потім екструзією при 100 °C крізь круглу головку

20 діаметром 0,5 мм. У деяких випадках висушений розпиленням склад піддають дії 100 °C протягом менше 30 хвилин.

Полімерний імплантат може містити, наприклад, від близько 1 % до близько 90 % антитіла проти VEGF (наприклад, близько 1 %, близько 5 %, близько 10 %, близько 20 %, близько 30 %, близько 40 %, близько 50 %, близько 60 %, близько 70 %, близько 80 % або близько 90 %) за вагою. У деяких випадках полімерний імплантат включає близько 10 % антитіла проти VEGF за вагою. Полімерний імплантат може мати будь-які відповідні розміри, наприклад, в деяких випадках імплантат має діаметр від близько 0,1 до близько 1 мм (наприклад, близько 0,5 мм) і довжину від близько 1 до близько 30 мм (наприклад, близько 14 мм). Для імплантатів PLGA (наприклад, стрижнів PLGA) відсоток полімолочної кислоти в PLGA-сополімері може становити

25 0-100 %, наприклад, близько 15-85 %, близько 35-65 % або 50 %. У деяких випадках PLGA-імплантат (наприклад, стрижень PLGA) може додатково включати один або більше додаткових полімерів, наприклад гідроксипропілметилцелюлозу (HPMC).

У будь-якому з попередніх полімерних складів (наприклад, депо полімерних розчинників, полімерні міцели і полімерні імплантати) антитіло може являти собою фрагмент антитіла, який зв'язує VEGF. У деяких випадках фрагмент антитіла обирають з групи, що складається з Fab, Fab', Fab'-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂ фрагментів. Наприклад, в деяких випадках фрагмент антитіла являє собою Fab, Fab' або Fab-C.

35

Будь-який з попередніх полімерних складів (наприклад, депо полімерних розчинників, полімерних міцел і полімерних імплантатів) може мати період окулярного напіввиведення, який збільшується щодо еталонного антитіла, яке не складено у вигляді полімерного складу. У деяких випадках період окулярного напіввиведення збільшують, щонайменше близько в 2 рази (наприклад, близько в 2 рази, близько в 3 рази, близько в 4 рази, близько в 5 разів, близько в 6 разів, близько в 7 разів, близько в 8 разів, близько в 9 разів, близько в 10 разів, близько в 12 разів, близько в 14 разів, близько в 16 разів, близько в 18 разів, близько в 20 разів або більше)

45

щодо еталонного антитіла. У деяких випадках період окулярного напіввиведення збільшується щонайменше близько в 4 рази відносно еталонного антитіла. У деяких випадках період окулярного напіввиведення являє собою життєвий період життя. У деяких випадках, еталонне антитіло ідентично антитілу полімерного складу. В інших випадках еталонне антитіло не ідентичне антитілу полімерного складу.

Будь-який з попередніх полімерних складів (наприклад, депо полімерних розчинників, полімерних міцел і полімерних імплантатів) може мати окулярний кліренс, який зменшується відносно еталонного антитіла, яке не складено у вигляді полімерного складу. У деяких випадках кліренс зменшується, щонайменше близько в 2 рази (наприклад, близько в 2 рази, близько в 3 рази, близько в 4 рази, близько в 5 разів, близько в 6 разів, близько в 7 разів, близько в 8 разів, близько в 9 разів, близько в 10 разів, близько в 12 разів, близько в 14 разів, близько в 16 разів, близько в 18 разів, близько в 20 разів або більше) щодо еталонного антитіла. У деяких випадках кліренс зменшується, щонайменше на близько в 4 рази відносно еталонного антитіла. У деяких випадках кліренс являє собою кліренс з склоподібного тіла. У деяких випадках, еталонне антитіло ідентично антитілу полімерного складу. В інших випадках еталонне антитіло не ідентичне антитілу полімерного складу.

50

55

60

У деяких випадках період часу між двома внутрішньоочними введеннями (наприклад, інтравітреальною ін'єкцією) будь-якого з попередніх полімерних складів становить щонайменше 1 місяць, наприклад, щонайменше 1 місяць, щонайменше 5 тижнів, щонайменше 6 тижнів, щонайменше 7 тижнів, щонайменше 8 тижнів, щонайменше 9 тижнів, щонайменше 10 тижнів, щонайменше 11 тижнів, щонайменше 12 тижнів, щонайменше 13 тижнів, щонайменше 14 тижнів, щонайменше 15 тижнів, щонайменше 16 тижнів, щонайменше 20 тижнів, щонайменше 24 тижні, щонайменше 28 тижнів, щонайменше 32 тижні, щонайменше 36 тижнів, щонайменше 40 тижнів, щонайменше 44 тижні, щонайменше 48 тижнів, щонайменше 52 тижні або більше. У деяких випадках максимальний період між двома внутрішньоочними введеннями триває не більше чотирьох років, наприклад, не більше трьох років, не більше двох років або не більше одного року. Полімерний склад можна вводити, наприклад, кожні два-дванадцять місяців, наприклад кожні чотири-десять місяців. У деяких випадках полімерний склад вводять кожні шість місяців.

Винахід також відноситься до композицій (наприклад, фармацевтичних композицій), які включають в себе будь-які полімерні складі (наприклад, депо полімерних розчинників, полімерні міцели і полімерні імпланти), описані вище. У деяких варіантах здійснення винаходу, композиція містить одне або більше додаткових сполук. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, обраної з групи, що складається з IL-1 β , IL-6; IL-6R; PDGF; ангіопоетина; ангіопоетина 2; Tie-2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліна; апеліна/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNF-альфа; HTRA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білків, генетично пов'язаних з ризиком AMD, такі як компоненти комплементу шляху C2, фактора B, фактора H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. Наприклад, в деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, біспецифічне антитіло проти VEGF/анти-Ang2, таке як RG-7716 або будь-яке біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, описане в WO 2010/069532 або WO 2016/073157, або його варіант) В іншому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6, наприклад, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics, див., Наприклад, WO 2016/073890), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, елсилімомаб, герилізмуаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 або їх варіант. У ще одному додатковому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6R, наприклад, токілізумаб (ACTEMRA®) (див., наприклад, WO 1992/019579), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237 або його варіант.

Винахід також відноситься до композицій (наприклад, фармацевтичних композицій), які включають в себе будь-які полімерні складі (наприклад, депо полімерних розчинників, полімерні міцели і полімерні імпланти), описані вище и додатковий антагоніст VEGF.

4. Прилади

Будь-яку з описаних в цих документах композицій (наприклад, антитіла проти VEGF, кон'югати антитіл, злиті білки і полімерні складі) можна вводити в око за допомогою пристрою доставки порт. Пристрій доставки порт являє собою багаторазовий пристрій, що імплантується, який може випускати терапевтичний агент (наприклад, антитіло проти VEGF) протягом декількох місяців (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 і більше місяців). Ілюстративні пристрої доставки порт, які можуть бути використані, включають в себе ті з ForSight Labs, LLC і/або ForSight VISION4, наприклад, як описано в публікаціях міжнародної патентної заявки № WO 2010/088548, WO 2015/085234, WO 2013/116061, WO 2012/019176, WO 2013/040247 і WO 2012/019047, які включені в цей опис за допомогою посилання у всій їх повноті.

Наприклад, винахід відноситься до пристроїв доставки порт, які містять у собі резервуари, що містять будь-які з описаних в цьому документі композицій (наприклад, антитіла проти VEGF, кон'югати антитіл, злиті білки і полімерні складі). Пристрій доставки порт може додатково містити проксимальний ділянку, трубчастий корпус, з'єднаний з проксимальною ділянкою, з'єднана з текучим середовищем з резервуаром, і один або більше виходів, сполучених по текучому середовищу з резервуаром і виконаних з можливістю впорскування композиції в око. Трубчастий корпус може мати зовнішній діаметр, який може бути вставлений через розріз або отвір в оці розміром близько 0,5 мм або менше. Довжина пристрою може складати від близько 1 мм до близько 15 мм в довжину (наприклад, близько 1 мм, близько 2 мм, близько 4 мм, близько 5 мм, близько 6 мм, близько 7 мм, близько 9 мм, близько 11 мм, близько 13 мм або близько 15 мм в довжину). Резервуар може мати будь-який відповідний обсяг. У деяких випадках резервуар має обсяг від близько 1 мкл до близько 100 мкл (наприклад, близько 1 мкл, близько 5 мкл, близько 10 мкл, близько 20 мкл, близько 50 мкл, близько 75 мкл або близько 100 мкл). Цей

пристрій або його складові частини можуть бути виготовлені з будь-якого відповідного матеріалу, наприклад полііміду.

У деяких випадках пристрій доставки порт включає резервуар, що містить будь-яку з описаних в даному документі композицій (наприклад, антитіла проти VEGF, кон'югати антитіл, злиті білки і полімерні склади) і одне або більше додаткових з'єднань. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, обраною з групи, що складається з IL-1 β , IL-6; IL-6R; PDGF; ангіопетина; ангіопетина 2; Tie-2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліна; апеліна/APJ; еритропетину; фактора комплементу D; TNF-альфа; HTRA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2; і білків, генетично пов'язаних з ризиком AMD, такі як компоненти комплементу шляху C2, фактора B, фактора H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення винаходу, додаткова сполука являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. Наприклад, в деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, біспецифічне антитіло проти VEGF/анти-Ang2, таке як RG-7716 або будь-яке біспецифічне анти-VEGF/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, описане в WO 2010/069532 або WO 2016/073157, або його варіант) В іншому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6, наприклад, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics, див., Наприклад, WO 2016/073890), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, елсилімомаб, герилізмуаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 або їх варіант. У ще одному додатковому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою антитіло проти IL-6R, наприклад, токілізумаб (ACTEMRA®) (див., наприклад, WO 1992/019579), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237 або його варіант.

У деяких випадках пристрій доставки порт включає в себе будь-яку з описаних в даному документі композицій (наприклад, антитіла проти VEGF, кон'югати антитіл, злиті білки і полімерні склади) і додатковий антагоніст VEGF.

III. Приклади

Нижче наведені приклади способів і композицій відповідно до даного винаходу. Слід розуміти, що з огляду на загальний опис, представлений вище, можна здійснити різні інші варіанти реалізації цього винаходу.

Приклад 1: Глибокий скануючий мутагенез G6.31 визначає позиції, важливі для складання стабільної зібраної Fab

G6.31 являє собою високоафінне антитіло проти VEGF (Fuh et al., J. Biol. Chem. 281(10):6625-6631 (2006); Liang et al., J. Biol. Chem. 281(2):951-961 (2006). G6.31 вважається представником людських антитіл, оскільки його варіабельні домени важкого і легкого ланцюгів часто використовуються зародковими лініями IGHV3-23 і IGKV1-39 людського походження, відповідно. Щоб систематично оцінювати вплив одиночних мутацій в доменах VH і VL G6.31, була створена насичена бібліотека мутагенезу одного сайту для кожного варіабельного домену (VL положення 2-107 та VH положення 2-113 згідно зі схемою нумерації Кабата). Ці бібліотеки називаються бібліотеками проходження VH і VL NNK відповідно. Використання цих бібліотек в глибокому мутаційному скануючому експерименті дозволило розрахувати коефіцієнт збагачення (ER) для кожної мутації в обох бібліотеках під час відбору, які служать оцінкою впливу мутації на придатність молекули. ER специфічної мутації агрегує безліч ефектів, включаючи вплив мутації на функціональну експресію, вплив мутації на стабільність згортання і вплив мутації на зв'язування з селекційним білком (наприклад, анти-gD (пептидна мітка, злита з C-кінцем легкого ланцюга), білок A, білок L або VEGF).

Щоб оцінити вплив кожної мутації на функціональну експресію і стабільність згортання Fab, бібліотеки VH і VL були пенінговані окремо проти анти-gD, білка A або білка L. Ці стратегії пенінгування виявляють, чи відображається молекула Fab на фагі і, в якійсь мірі, чи правильно він згорнутий і зібраний. ER для 2331 і 2226 амінокислотних замін (включаючи стопи) і відповідної амінокислоти дикого типу в даному положенні бібліотеки важкого ланцюга і бібліотеки легкого ланцюга, відповідно, визначали для кожного з трьох пенінгів (фіг.1A-1F). Порівняння трьох стратегій пенінгування важкого ланцюга або трьох пенінгів легкого ланцюга показує, що дуже схожі результати були отримані (фіг.2A-2B). Наприклад, ER показують хорошу лінійну залежність ($r^2=0,98$) між анти-gD і пенінгуванням білка L (фіг.2A). Порівняння між набором даних пенінгування білка A і набором даних пенінгування білка L показало більш низьку лінійну кореляцію ($r^2=0,611$), що можна віднести до підмножини мутацій, які безпосередньо впливають на зв'язування білка A і, отже, диференціальне збагачення в двох відборах. Аналогічна картина спостерігалася для легкого ланцюга (фіг. 2B).

В одному підході для визначення позицій, які впливають на функціональну експресію і стабільність Fab, визначалися положення, які були консервативні і які не переносять мутації під

час відбору. Використовуючи набір даних, отриманий з пенінга анти-gD як репрезентативного сканування, середній коефіцієнт збагачення всіх мутацій в цій позиції (ER_{pos}) був розрахований для кожної позиції як міра консервативності (фіг. 3A-3B). В обох доменах VH і VL центральні залишки ядра, які складаються з пари цистеїну (HC-C22, HC-C93, LC-C23, LC-88) між β -нитками В і F, а також суміжний залишок триптофану (HC-W36, LC-W35) були висококонсервативними (фіг.3A-3D). Гідрофобне ядро складки імуноглобуліну описано, наприклад, у Halaby et al. *Protein Engineering* 12 (7): 563-571, 1999. Поруч з центральним ядром знаходяться кілька гідрофобних залишків, розташованих в нижній половині молекули (коли Fab орієнтований так, що HVR звернені вгору), які є частиною розширеного гідрофобного ядра. Вони були консервативні, але показали менші значення ER_{pos} , ніж центральні залишки ядра. Серед цих залишків є тирозин (HC-Y90, HC-86), який, як було показано раніше, важливий для стабільності Ig-складки (див., наприклад, Hamill et al., *J. Mol. Biol.* 295(3):641-649 (2000)). Третя група консервативних залишків перебувала в інтерфейсі VH/VL (HC-L45, HC-Y91, HC-W103, LC-P44, LC-Y36, LC-Y96). Залишки інтерфейсу VH/VL були не тільки консервативні в пенінзі з непрямим вибором (наприклад, дані VH з пенінга білка L), але також і прямим вибором (наприклад, дані VH з пенінга білка A), що вказує на те, що мутації в згаданих положеннях інтерфейсу привели до зібраного Fab зі зниженою стабільністю. Четверта група консервативних залишків (HC-E46, HC-R38, HC-D86, LC-R61, LC-D82) включає залишки у водневих мережах зв'язку в нижній половині Fab, які важливі для стабільності. Особливо аспартатний залишок в $\alpha 1$ -спіралі відноситься до позицій, які показали одну з найвищих консервативних в наборі даних. Мутація в положенні LC-R61 і LC-D82 була показана раніше, щоб індукувати утворення фібрил та індукувати агрегацію в легких ланцюгах (див. Helms et al., *J. Mol. Biol.* 257(1):77-86 (1996)). Нарешті, чотири позиції в HVR-H3 були ідентифіковані як висококонсервативні: HC-A93, HC-R94, HC-P100, HC-D101. Оскільки ці стратегії пенінга не були відібрані для зв'язування антигену, ці результати показали, що конформація петлі HVR3 пов'язана зі стабільністю Fab.

Таким чином, за винятком того, що кілька позицій варіабельних доменів є висококонсервативними, багато позицій можуть переносити мутації, не впливаючи на загальну стабільність і експресію молекули Fab в цих селекціях. Крім того, навіть деякі позиції, які мають невеликий ER_{pos} , можуть переносити консервативні амінокислотні заміни. Наприклад, дані мутагенезу показали, що гідрофобні залишки нижньої серцевини можуть бути замінені аналогічним гідрофобним залишком, не впливаючи на стабільність Fab (фіг. 1A-1F). Толерантність VH/VL стабільності для окремих заміщень контрастує з результатами, отриманими при глибокому скануванні мутагенезу домену CH3 IgG1 людини, в якому більшість залишків не переносить ніяких мутацій (див. Traхylmayr et al., *J. Mol. Biol.* 423(3):397-412 (2012)).

Матеріали і способи

А. Розробка і створення повного варіабельного домену бібліотеки проходження NNK.

Повні VH (залишки 2-113) і VL (залишки 2-107) G6.31 піддавалися рандомізації. 10-12 наступних залишків були рандомізовані на кожну суб-бібліотеку. Усередині суб-бібліотеки TAA кодон вводили в кожну рандомізовану позицію за допомогою мутагенезу Кункеля (Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(2):488-492 (1985)). Було створено 10 VL суб-бібліотек і 12 VH суб-бібліотек стоп-зразків. Для проектування бібліотеки кожна позиція була рандомізована олігонуклеотид-спрямованим мутагенезом з кодоном NNK, де N являє собою будь-який з чотирьох природних нуклеотидів, а K являє собою 50 % Т (тимін) і 50 % G (гуанін). Кодон NNK може кодувати будь-яку з 20 природних амінокислот. Суб-бібліотеки для легкого ланцюга і важкого ланцюга були зроблені окремо, а потім відповідно бібліотеки для кожного ланцюжка були об'єднані з утворенням бібліотеки VL і бібліотеки VH. Об'єднані бібліотеки також називаються бібліотеками проходження NNK VH або VL. Бібліотеки були зроблені в векторі відображення фагового Fab-фрагмента. Бібліотека проходження NNK VH мала розмір 3×10^9 членів, а бібліотека проходження NNK VL мала розмір 8×10^8 членів.

В. Відбір пенінга фага на анти-gD, білку L або білку A

Зв'язуючі клони відбирали шляхом інкубації бібліотеки проходження фагового дисплея NNK VH або VL з 5, 0,5, 0,1 нМ біотинільованого VEGF в послідовних раундах відбору, а потім конкурували зі 100 нМ небіотинільованого VEGF при кімнатній температурі або 37 °C для зменшення зв'язування клонів з низькою афінністю до VEGF. Пов'язані клони фіксували на пластинах ІФА, покритих нейтравідином, промивали і елюювали в 100 мМ HCl протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Елюйований фаг нейтралізували 1/10 об'єму 1 М Трис рН 8,0 і використовували для зараження *E. coli* для ампліфікації для наступного раунду відбору.

Для відбору за допомогою анти-gD, білка L або білка A клони для зв'язування обирали шляхом інкубації бібліотеки проходження фагового дисплея NNK VH або VL на пластинах ІФА, покритих анти-gD, білком L або білком A, промивали і елюювали 100 мМ HCl протягом 20 хвилин при

кімнатній температурі. Елюйований фаг нейтралізували 1/10 об'єму 1 М Трис рН 8,0 і використовували для зараження *E. coli* для ампліфікації для наступного раунду відбору.

С. Illumina секвенування глибоко мутаційних скануючих бібліотек G6.31

Для глибокого секвенування, ДНК фагемідів виділяли з клітин XL1 *E. coli*, що переносять вектори фагемідів, або з не обраної, або з обраної бібліотеки проходження NNK VH або VL. Очищену ДНК використовували як матрицю для ПЛР на основі обмеженого циклу ампліфікації ділянок VL і VH. Продукти ПЛР очищали екстракцією і очищенням за допомогою агарозного гелю (комплект для екстракції гелю Qiagen). Елюйована ДНК ампліконів використовувалася в якості основи для підготовки бібліотеки глибокого секвенування зі стандартними методами підготовки бібліотеки Illumina з використанням зразка проб ДНК TRUSEQ™ (Illumina). Бібліотеки, пов'язані з адаптерами, піддавали однократному циклу ПЛР і секвенували на Illumina MISEQ®, парному кінці 300 п.о., щоб покрити всю довжину амплікона.

D. Аналіз даних глибинного сканування мутагенезу

Послідовні парні зчитування кінців були об'єднані з використанням FLASh (Magoč et al., Bioinformatics 27 (21): 2957-2963 (2011)). Подальший аналіз даних послідовності виконувався з використанням мови статистичного програмування R (Team RC "R: A language and environment for statistical computing" R Foundation for Statistical Computing (2014)) і пакеты ShortRead (Morgan et al., Bioinformatics 25(19):2607-2608 (2009)). Першим кроком у контролі якості була фільтрація для послідовностей, які містили відповідний HC і LC штрих-код. На другому етапі фланкуючі ділянки домену VH і VL були ідентифіковані для кожного об'єданого зчитування і перевірені на правильну довжину, щоб видалити переважно більшість читань з мутаціями вставки або делеції (indels). Щоб додатково виправити помилки послідовності, мутації, відмінні від NNK, були перетворені назад в базу дикого типу, і дані, що містять більше двох мутацій NNK, були відфільтровані. Матриці маси позиції були згенеровані шляхом обчислення частоти всіх мутацій кожної рандомізованої позиції. Коефіцієнти збагачення для всіх мутацій розраховувалися шляхом ділення частоти даної мутації в цій позиції у відсортованому зразку з частотою тієї ж самої мутації в несортваному зразку, як описано раніше (Fowler et al., Nature Methods 7 (9)): 7412-746 (2010)).

Приклад 2: Скринінг глибокого скануючого мутагенезу G6.31 ідентифікує варіанти амінокислотних залишків з підвищеною стабільністю і/або поліпшеною афінністю зв'язування з VEGF

Щоб отримати вичерпний огляд впливу одиночних заміщень G6.31 на зв'язування антигену, бібліотеки проходження NNK VH і VL, описані в прикладі 1, були піддані пенінгу проти VEGF (фіг.4A-4B). Отримані значення коефіцієнта збагачення (ER) показали бімодальний розподіл (фіг.5A-5B). Підмножина мутацій сильно негативно вплинула на функцію зв'язування, тоді як більшість мутацій були нейтральними, і кілька мутацій сильно позитивно вплинули на придатність. Мутації, які негативно впливали на зв'язування, здебільшого перебували або в HC-HVR, так як ці петлі, як вважають, забезпечують більшу частину функції зв'язування G6.31 або в консервативних залишках каркаса, як визначено в пенінгі анти-gD (див. приклад 1). Сильно збагачені мутації були розташовані головним чином в менш консервативному розділі каркасних ділянок і HC-HVR. Ці результати підтверджують спостереження з gD-пенінга, описаного вище (див. Приклад 1), що варіабельні домени є надійними і можуть переносити багато одиночних мутацій без істотного впливу на антигензв'язуючу функцію Fab.

Для підтвердження результатів, отриманих при глибокому скануючому мутагенезі, вибрані мутації були експресовані та очищені, а їх афінність до VEGF була виміряна з використанням поверхневого плазмонного резонансу BIACORE® (SPR), і їх термостабільність (відповідно до оцінки температури плавлення T_m) вимірювалася з використанням диференціальної скануючої флуориметрії (DSF). Було оцінено вплив обраних сильнозбагачених мутацій на зв'язування і фолдінг антигену. Крім того, мутації з високим збагаченням вибиралися виходячи з їх появи в цій позиції в людських антитілах відповідно до бази даних Absis. Крім того, деякі мутації, які були сильно виснажені, також тестувалися як негативний контроль. K_d і T_m зазначених варіантів G6.31 показані в таблиці 2. Значення K_d , перераховані в таблиці 2, були виміряні з використанням кінетичного аналізу з одним циклом з використанням пристрою BIACORE® T200.

Таблиця 2

Характеристика варіантів G6.31, ідентифікованих методом глибокого скануючого мутагенезу

Клон	K_{on} (1/Mc)	K_{off} (1/c)	K_d (нМ)	Різниця згортання (щодо G6.31)	Температура плавлення (°C)
G6.31 ДТ	4,45E+05	6,86E-04	1,54	--	83,4
LC-Q3A	3,89E+05	3,59E-04	0,92	1,7	82,8
LC-M4Q	5,93E+05	6,57E-04	1,11	1,4	72,8
LC-S7Q	7,31E+05	6,71E-04	0,92	1,7	83,2
LC-S9Q	1,47E+06	6,55E-04	0,44	3,5	83,2
LC-S12M	8,94E+05	6,79E-04	0,76	2,0	82,9
LC-G16K	3,67E+05	3,56E-04	0,97	1,6	79,1
LC-T22D	4,87E+05	3,48E-04	0,72	2,1	81,8
LC-D28R	1,17E+06	6,55E-04	0,56	2,8	80,6
LC-Y36G	2,25E+05	5,58E-04	2,47	0,6	66,8
LC-Q37A	6,03E+05	5,15E-04	0,85	1,8	81,6
LC-S50M	4,67E+05	6,11E-04	1,31	1,2	84,5
LC-L73G	5,89E+05	6,44E-04	1,09	1,4	68,8
LC-F83A	8,55E+05	4,33E-04	0,50	3,1	88,8
LC-Q89N	9,91E+05	4,35E-04	0,44	3,5	79,6
LC-Q89T	1,17E+06	4,93E-04	0,42	3,7	79,1
LC-T97N	4,32E+05	8,02E-04	1,86	0,8	81
LC-N94A	3,34E+05	1,31E-03	3,93	0,4	85,8
LC-N94Q	2,78E+05	1,33E-03	4,78	0,3	84,6
HC-V2R	4,64E+05	3,41E-04	0,73	2,1	81,6
HC-S7L	7,36E+05	5,68E-04	0,77	2,0	83
HC-Q13M	1,26E+06	5,19E-04	0,41	3,8	83,1
HC-A40E	1,13E+06	4,66E-04	0,41	3,8	83
HC-I51H	2,48E+06	1,52E-03	0,62	2,5	83,1
HC-A53R	8,29E+05	3,50E-04	0,42	3,7	84,3
HC-T57E	1,93E+06	4,02E-04	0,2	7,7	84,4
HC-Y58R	1,48E+06	2,55E-04	0,17	9,1	83,2
HC-Y58Q	3,52E+05	3,58E-04	1,02	1,5	84,2
HC-Y59T	3,60E+05	9,74E-04	2,71	0,6	82,9
HC-A60M	3,86E+05	7,29E-04	1,89	0,8	82,8
HC-S70H	6,58E+05	6,60E-04	1	1,5	83
HC-T73N	6,78E+05	5,75E-04	0,85	1,8	83,1
HC-Q81S	1,07E+06	4,87E-04	0,45	3,4	83
HC-Q81W	1,20E+06	5,42E-04	0,45	3,4	83,2
HC-N82aR	1,39E+06	322E-04	0,23	6,7	83,1

- Використовуючи дані з 34 мутацій (16 на VH і 18 на VL), не спостерігалось лінійної залежності між коефіцієнтом збагачення і отриманим поліпшенням в афінності або стабільності (фіг.5C-5D). Аби не допустити пов'язувати себе теорією, це може відображати той факт, що на ER впливає безліч факторів, включаючи функціональну експресію в *E. coli*, стабільність Fab на фаговій частці, а також зв'язування з селекційним білком. Одним із прикладів, що ілюструють це, є мутація LC-L73G, яка є частиною гідрофобного ядра легкого ланцюга. Заміна гідрофобного лейцину в цьому положенні гліцином, ймовірно, зменшує упаковку в серцевині і призводить до менш стабільного легкого ланцюга. T_m мутанта LC-L73G на 14,4 °C нижче, ніж у G6.31 Fab. Мутація LC-L73G була виснажена в експерименті по пенінгу VEGF, хоча вона не робила помітного впливу на антигензв'язуючу афінність, як виміряно BIAcore® SPR (приблизно в 1,6 рази більше (тобто більш низьке K_d) в афінності в порівнянні з G6.31 дикого типу). Виснаження G6.31LC_{L73G}, ймовірно, було наслідком зменшення відображення мутанта на фагі, і цей ефект домінував над вибором цього мутанта в порівнянні з фактичним вибором антигену. Крім того, вірно і зворотне: мутація, яка збільшує відображення (наприклад, шляхом посилення експресії

та/або стабільності), може бути збагачена, хоча фактична функція зв'язування антигену порушена або не змінена в порівнянні з диким типом (генерування помилково позитивно). Тому варіанти, ідентифіковані за допомогою збагачення, можуть бути поліпшені для афінності зв'язування, стабільності, експресії і/або інших властивостей.

- 5 Дві мутації в HVR-H2, ідентифіковані методом глибокого скануючого мутагенезу, HC-T57E і HC-Y58R, мали найбільше збільшення афінності (в 8-9 разів) в порівнянні з G6.31 дикого типу (фіг.5E). Мутація каркасної ділянки, HC-N82aR, призвела до приблизно збільшення афінності в 6,6 разів у порівнянні з G6.31 дикого типу (фіг.5E). Кілька інших мутацій каркасної ділянки показали збільшення афінності в 2-4 рази в порівнянні з G6.31 дикого типу (фіг.5E-5F).
- 10 Найбільше збільшення термостабільності було отримано при мутації легкого ланцюга LC-F83A (+ 5,4 °C) (фіг.5F). На додаток до збільшення температури плавлення LC-F83A збільшував афінність G6.31 до VEGF в 3 рази. Дивно, але багато з мутацій, які приводили до збільшення афінності, були розташовані дистальніше антигензв'язуючого сайту (фіг.5E-5F). Серед них був HC-N82aR, який розташований в петлі між спіраллю $\alpha 1$ і ниткою β E, більш ніж на 22Å від антигензв'язуючого сайту, і LC-F83A, який розташований на кордоні між VL і легким ланцюгом константного домену (CL), більш ніж на 25Å від HVR.

Таким чином, глибокий скануючий мутагенез G6.31 з використанням бібліотек проходження NNK VH і VL і сіквенування нового покоління ідентифікували зміни амінокислотних залишків, які збільшували спорідненість зв'язування з VEGF і/або стабільність Fab.

20 Матеріали і способи

А. Вибір пенінга фагів на VEGF

Зв'язуючі клони відбирали шляхом інкубації бібліотеки проходження фагового дисплея NNK VH або VL (описаної в прикладі 1) з 5, 0,5, 0,1 нМ біотинільованим VEGF в послідовних раундах відбору, а потім конкурували з 100 нМ небіотинільованим VEGF при кімнатній температурі або 25 37 °C для зменшення зв'язування клонів з низькою афінності до VEGF. Пов'язані клони фіксували на пластинах ІФА, покритих нейтравідином, промивали і елюювали в 100 мМ HCl протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Елюйований фаг нейтралізували 1/10 об'єму 1 М Трис рН 8,0 і використовували для зараження E. coli для ампліфікації для наступного раунду відбору.

30 В. Illumina сіквенування глибоко мутаційних скануючих бібліотек G6.31 и аналіз даних

Для глибокого сіквенування, ДНК фагемідів виділяли з клітин XL1 E. coli, що переносять вектори фагемідів, або з не обраної, або з обраної бібліотеки проходження NNK VH і VL, підданих впливу VEGF. Очищену ДНК використовували як матрицю для ПЛР на основі обмеженого циклу ампліфікації ділянок VL і VH. Продукти ПЛР очищали екстракцією і очищенням за допомогою агарозного гелю (комплект для екстракції гелю Qiagen). Елюйована ДНК ампліконів використовувалася в якості основи для підготовки бібліотеки глибокого сіквенування зі стандартними методами підготовки бібліотеки Illumina з використанням зразка проб ДНК TRUSEQ™ (Illumina). Бібліотеки, пов'язані з адаптерами, піддавали однократному циклу ПЛР і сіквенували на Illumina MISEQ®, парному кінці 300 п.о., щоб покрити всю довжину амплікона. Аналіз даних проводили, як в прикладі 1, для розрахунку матриці вагових позицій і коефіцієнтів збагачення.

С. Експресія антитіла

VH і VL послідовності обраних варіантів були клоновані в вектор Fab ссавців для експресії. Плазмідні як для важкого, так і легкого ланцюгів трансфікували (15 мкг) в 30 мл 293Т-клітин протягом 7 днів. Супернатант збирали для очищення за допомогою колонки білка G.

Д. Визначення афінності антитіл за допомогою BIACORE® SPR

Для визначення афінності зв'язування обраних варіантів Fab, використовувався вимір SPR за допомогою приладу BIACORE® T200. Якщо коротко, чіп CM5 серії S був активований реагентами 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіімідів (EDC) і N-гідроксисукциніміда (NHS) відповідно до інструкцій постачальника, а людський VEGF (hVEGF) з'єднували для досягнення 50-80 одиниць відповіді (RU), потім слідуючи за блокуванням непрореагувавших груп з 1М етаноламіном.

- 55 Були введені триразові серійні розведення Fab в буфері HBS-P (0,01 М HEPES, рН 7,4, 0,15 М NaCl, 0,005 % поверхнево-активної речовини P20) від низьких (0,02 нМ) до високих (50 нМ) (швидкість потоку: 30 мкл/хв). Реакції зв'язування на hVEGF коректувалися шляхом вирахування RU з порожньої проточної клітини. Сенсорграма була записана і підлягає оцінці і відніманню з буфера перед оцінкою за допомогою програмного забезпечення BIACORE® T200 Evaluation Software (версія 2.0). Коефіцієнт асоціації (k_{on}) і швидкості дисоціації (k_{off}) були

розраховані з використанням простої індивідуальної моделі прив'язки Ленгмюра. Константа рівноважної дисоціації (K_d) розраховувалася як відношення K_{off}/K_{on} .

Е. Визначення температури плавлення (T_m) методом диференціальної скануючої флуориметрії. Диференціальна скануюча флуориметрія (DSF) контролює термічне розгортання білків у присутності флуоресцентного барвника і зазвичай виконується з використанням приладу ПЛР реального часу (наприклад, Bio-Rad CFX). SYPRO® Помаранчевий барвник (Invitrogen, кат. № S6650) розбавляли 1:20 в натрій-фосфатному буфері (PBS). 1 мкл розведеного барвника додавали в 24 мкл білка Fab (приблизно 100 мкг/мл) на лунку. Температуру підвищували від 20 до 100 °C з використанням приладу ПЛР реального часу (Bio-Rad CFX), і була розрахована інтенсивність флуоресценції, а точку перегину кривої переходу (T_m) розраховували з використанням таких рівнянь, як рівняння Больцмана (див., наприклад, Niesen et al., *Nature Protocols* 2 (9): 2212-2221 (2007)).

Приклад 3: Конформаційні зміни LC-F83 корелюють з конформацією вигину Fab в структурах G6. Щоб зрозуміти, як мутації, просторово віддалені від сайту зв'язування антигену, можуть надавати такий сильний вплив на зв'язування і стабільність антигену, структурний ефект мутації LC-F83A було розглянуто більш докладно. Батьківське антитіло G6.31, G6, раніше кристалізувалося в VEGF-пов'язуючих і VEGF-вільних формах (Fuh et al., вище). G6.31 містить тільки чотири заміни в HVR-L3 в порівнянні з G6. Тому кристалічна структура G6 використовувалася в якості моделі для G6.31. Кристалічна структура вільної від VEGF форми G6 містить 12 молекул Fab в асиметричній одиниці. Структури Fab можуть бути згруповані у дві різні групи, засновані на орієнтації константних доменів на змінні домени (інтерфейс V-C) (фіг.6A), який є результатом різних конформацій в ділянці вигину Fab і може бути визначений кількісно шляхом вимірювання кута вигину Fab (див., наприклад, Stanfield et al., *J. Mol. Biol.* 357(5):1566-1574 (2006)).

Гнучкість кута вигину Fab залежить від кульового шарнірного з'єднання в важкому ланцюгу (див., наприклад, Lesk et al., *Nature* 335 (6186): 188-190 (1988)), але також і, можливо, більш важливо, де домінує клас легкого ланцюга. Хоча антитіла легкого ланцюга капа, як правило, обмежені по куту вигину, вони можуть адаптуватися і демонструвати бімодальний розподіл, що досягає максимуму приблизно 140° і приблизно 175°, рідко перевищує 180°, антитіла легкого ланцюга лямбда можуть приймати більш широкий діапазон кутів (див., наприклад, Stanfield et al., вище). Шість молекул G6 в кристалічній структурі мають невеликі кути вигину (143-155°) і щільну упаковку DE-петлі домену CL проти $\alpha 1$ VL, тоді як інші шість молекул мають великий кут вигину (170-187°) з вільно упакованим інтерфейсом VL-CL (фіг.6B-6C). Розподіл області інтерфейсу різних Fab-молекул, що мають слабо упакований або щільно упакований інтерфейс VL-CL, показано на фіг.7C. Щільно упакована площа інтерфейсу становить в середньому близько 600 Å², а площа слабо упакованої поверхні становить приблизно 450 Å². Подальший і більш детальний аналіз показав, що шість молекул G6 вільний мають невеликі кути вигину (143-155°), які пов'язані з щільно упакованим інтерфейсом VL-CL (що включає DE-петлю CL домену, упакованого проти $\alpha 1$ VL, 304±48 Å²), тоді як інші шість мають великий кут вигину (170-187°) з менш щільно упакованим інтерфейсом VL-CL (площа інтерфейсу 234±29 Å²). Таким чином, кристалічна структура G6 показує, що G6 поводить себе як легкий ланцюг капа типового людського антитіла з кутами вигину нижче 180° (фіг.6A-6C).

Конформація бічного ланцюга LC-F83 корелювала зі змінами кута вигину Fab. У структурах з великим кутом вигину LC-F83 щільно зв'язаний в гідрофобній кишені (згадується як "в" конформації) в ділянці дистального закупорювання домену VL (фіг.6C). У структурах невеликого вигину LC-F83 виходить (згадується як "поза" конформації) з гідрофобної кишені і частково піддається впливу розчинника (фіг.6B). Незважаючи на те, що LC-F83 розташований в просторі близько до області вигину Fab, він не є частиною вигину. Однак конформаційні зміни LC-F83 відображаються змінами положення бічного ланцюга залишку вигину LC-I106. У структурах, в яких LC-F83 є "поза" конформації, бічний ланцюг LC-F106I переміщується "вгору" і займає гідрофобну кишеню. Навпаки, в структурах, в яких LC-F83 знаходиться в "в" конформації, бічний ланцюг LC-I106 переміщується "вниз" (зверніть увагу, що орієнтації "вгору" і "вниз" описані з посиланням на HVR як "вгору" і константний домен знаходиться "внизу"). На відміну від LC-F83, рух LC-I106 не обмежується бічним ланцюгом і призводить також до конформаційних змін в остові білка (LC-105 Ф-кут, LC-106 ψ -кут), що, ймовірно, призводить до спостережуваних різних кутів вигину. Таким чином, кристалічні структури G6 припускають, що зміни кута вигину в G6 вимагають конформаційних змін в положенні LC-I106 і LC-F83.

Приклад 4: Зв'язок конформацій LC-83F з LC-106I є спільною рисою в структурах антитіл людини

G6/G6.31 походить з бібліотеки фагів, яка побудована на загальних каркасних ділянках для важкого і легкого ланцюгів (Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004)). Найближчими генами зародкової лінії легкого ланцюга є IGKV1-39 і IGKJ1. Найбільш часто використовувані підгрупи IGKV людини, згідно з базою даних IMGT (Lefranc et al., In Silico Biology 5 (1): 45-60 (2005)), IGKV1 і IGKV3 несуть фенілаланін в положенні LC-83, тоді як інші менш часто використовувані зародкові лінії зазвичай містять валін (IGKV2 і IGKV4) або аланін (IGKV5 і IGKV6) в положенні 83. Ізолейцин в положенні LC-106 зберігається у всіх п'яти генах зародкової лінії IGKJ людини.

Щоб визначити, чи є зв'язування конформації бічного ланцюга положення F83 з конформацією вигину Fab спільною рисою в людських антитілах, конформацію LC-F83 визначали в 319 кристалічних структурах Fab з банку даних о білках (PDB). Структури були згруповані як структури з LC-F83 в "в" конформації (двогранний кут χ_1 між -50° і -100°) і структурами у "поза" конформації (кут χ_1 в основному між 50° і 180°) (фіг. 7A). Конформація LC-F83 корелювала в переважній більшості структур зі змінами в ділянці вигину Fab в положенні LC-106 (фіг.7B). Крім того, дві групи демонстрували значні відмінності у куті вигину (фіг.7C), а також в області інтерфейсу V-C, демонструючи, що структури з великим кутом вигину мають менший, менш щільно упакований інтерфейс V-C, тоді як структури з великим кутом вигину має великий інтерфейс V-C (фіг.7C).

Так як мутація LC-F83A приводила до більш високої термостабільності і більш високої афінності до антигену, визначали кут вигину 20 людських Fab-структур, доступних в PDB, несучих LC-83A і LC-106I. Ці структури відображали властивості структур "поза" конформації LC-83F: вони проявляли невеликий кут вигину і великий інтерфейс V-C (фіг.7C).

Таким чином, ці результати показали, що бімодальний розподіл за кутом вигину Fab антитіл легкого ланцюга капа людини, як спостерігалось раніше (Stanfield et al., вище), в основному є результатом різних конформацій бічного ланцюга фенілаланіну в положенні LC-83. Дані далі показали, що тип амінокислоти, яка присутня в положенні LC-83, має великий вплив на кут вигину Fab.

Матеріали і способи

Структури людських антитіл були отримані з бази даних структурних антитіл (SAbDab, Dunbar et al., Nucleic Acids Research 42: D1140-1146 (2014)). Фільтрування додаткової структури і обробка структури (зміна нумерації амінокислот, визначення двогранного кута, структурні вирівнювання) виконували з використанням Bio3D (Grant et al., Bioinformatics 22 (21): 2695-2696 (2006)). Площа інтерфейсу між константними і змінними доменами розраховувалася з використанням локального прикладу CCP4-Pisa (Krissinel et al., J. Mol. Biol. 372(3):774-797 (2007)). ABangle (Dunbar et al., Protein Eng. Des. Sel. 26 (10): 611-620 (2013)) був використаний для характеристики взаємодії VH-VL. Для розрахунку кута вигину використовувався Rymol і загальнодоступний скрипт.

Приклад 5: Моделювання молекулярної динаміки підтверджує, що положення LC-83 діє як перемикач до переходу між великою і малою конфігурацією вигину Fab

Молекулярну динаміку використовували для отримання подальшого розуміння ефектів мутації LC-F83A, ідентифікованих в структурному мета-аналізі, описаному в прикладі 4. Ефект мутації LC-F83A був імітований в двох різних структурних фонах. Використовувалася кристалічна структура G6 Fab з великим кутом вигину (ланцюги G6 VU, "VU.F83") і кристалічна структура з невеликим кутом вигину (ланцюги G6 BA, "BA.F83"). Обидві структури на додаток до мутуваних структур (VU.F83A і BA.F83A) були змодельовані протягом 100 нс в воді. Під час моделювання ніяких змін в конформації F83 не спостерігалось: у разі VU.F83, LC-F83 залишався в "в" конформації, тоді як у разі BA.F83 залишок залишався у "поза" конформації (фіг.8A). Порівняння змін кута вигину в часі протягом моделювання показало, що кути вигину всіх чотирьох молекул залишалися досить стабільними під час моделювання після початкової фази врівноважування близько 25 нс (фіг.8B). Чи не спостерігалось статистично значущої різниці в розподілі кутів вигину BA.F83 і BA.F83A. Для обох молекул кут вигину коливався близько 135° . Проте, була значна різниця між кутом вигину VU.F83 і VU.F83A під час симулювання. Протягом перших 25 нс симулювання кут вигину VU.F83A колапсував і коливався близько 140° , а кут вигину VU.F83 залишався стабільним під великим кутом 161° (фіг.9A).

Результати, представлені вище, демонструють важливість "в" конформації LC-F83 для стабілізації великого кута вигину Fab. Мутація LC-F83A призвела до негайного переходу до малого кута вигину і великого інтерфейсу VL-CL в імітуванні молекулярної динаміки. Оскільки не було ніякого переходу бічного ланцюга LC-F83 від "в" до "поза" конформації і навпаки, ці результати показують, що LC-F83 накладає значний енергетичний бар'єр на зміни кута вигину молекули.

У сукупності збільшення термостабільності G6.31_{LC-F83A} в порівнянні з G6.31 можна пояснити збільшенням області взаємодії інтерфейсу V-C, яка, в свою чергу, додатково стабілізує складку чотирьох доменів Fab. Крім того, більш щільна упаковка в інтерфейсі V-C знижує розчинність гідрофобних залишків, таких як LC-I106.

5 Матеріали і способи

Імітація молекулярної динаміки проводилася з використанням amber12 (Case et al., J. Comput.Chem. 26(16):1668-1688 (2005)). Якщо не вказано інше, 100 нс моделювалися при постійному тиску і 300 К. Перед імітацією, секції в константних доменах структур G6, які не були вирішені через відсутність електронної щільності, були доповнені з використанням PDB введення 4hh9. Отримані імітовані структури аналізували з використанням VMD (Humphrey et al., Journal of Molecular Graphics 14 (1): 33-38, 27-38 (1996)), Bio3d, CCP4-Pisa, Pymol і ABangle.

Приклад 6: Динаміка кута вигину G6 Fab впливає на антигензв'язуючий інтерфейс шляхом модуляції кута крутіння VH-VL

У той час як зміна кута вигину Fab пояснювало збільшення температури плавлення в варіанті LC-F83A, ефект цієї мутації на зв'язування антигену безпосередньо не пояснювався зміною динаміки вигину Fab. Аби не допустити зв'язування себе теорією, мутація LC-F83A може побічно впливати на антиген-зв'язування за допомогою зміни кута вигину Fab або безпосередньо впливати на антиген-зв'язування, оскільки LC-F83A знаходиться близько до VH-VL-інтерфейсу і може впливати на орієнтацію доменів VH і VL один до одного. Інтерфейс VH-VL, хоча і не знаходиться в прямому контакті з антигеном, може чинити сильний вплив на афінність антиген-зв'язування (див., наприклад, Masuda et al., FEBS J. 273 (10): 2184-2194 (2006), Khalifa et al., Journal of Molecular Recognition 13 (3): 127-139 (2000)). Крім того, у вільному від антигену стані, VH-VL-інтерфейс Fab зазвичай є гнучким, з антиген-зв'язуванням, що призводить до збільшення жорсткості (Dunbar et al., Prot. Eng. Des. Sel. 26(10):611-620 (2013)). Крім того, орієнтація VH-VL може мати відчутні відмінності між ліганд-вільною та антиген-зв'язаною формою (див., наприклад, Stanfield et al., Structure 1 (2): 83-93 (1993)).

Дійсно, кристалічні структури G6 показали гнучкість і суттєві відмінності в кутах крутіння VH/VL (кут крутіння HL) між різними антиген-вільними структурами G6 (G6_{незв'язаний}) і VEGF-зв'язаними структурами (G6_{зв'язаний}). Середній кут крутіння VH/VL (кут крутіння HL) шести G6_{вільних} молекул, які мають великий кут вигину, становить приблизно 60°, в той час як для шести молекул, які мають невеликий вигин, приблизно 58°. Це, в свою чергу, істотно ближче до середнього кута крутіння HL G6_{VEGF}, який становить -55° (фіг.9B).

Імітування молекулярної динаміки використовувалося для виключення можливості того, що ці зміни кута крутіння були артефактом кристалізації. Середній кут крутіння HL для VU.F83 становить приблизно 62°, в той час як для BA.F83 був приблизно 59°, що відповідає результатам, знайденим в кристалічних структурах G6_{незв'язані}. Більш того, два мутантних Fab (BA.F83A і VU.F83A) демонстрували ще менший кут крутіння (приблизно 57° і приблизно 57° відповідно), що ще ближче до кута крутіння, що спостерігається в структурах G6_{зв'язані} (фіг.9C). Більш того, мутація в LC-F83A передбачала додатковий ефект мутації на VH-VL-інтерфейсі, оскільки HL-кут BA.F83A був значно менше, ніж у BA.F83 ($p < 0,0001$)

Ці результати показали, що мутація LC-F83A впливає на кут крутіння HL і, в свою чергу, зв'язує антиген двома різними механізмами. По-перше, мутація LC-F83A опосередковує це побічно, змінюючи кут вигину Fab. Структурні дані і моделювання молекулярної динаміки показали, що існує кореляція між кутом вигину і кутом HL (фіг. 8A-8C і 9A-9D). По-друге, LC-83 безпосередньо впливає на інтерфейс VH-VL. Спостерігалось додаткове значне збільшення кута крутіння HL при введенні LC-F83A (фіг.9A-9D, порівняння молекул BA.F83 і BA.F83A). Результатом є конфігурація сайту зв'язування антигену в антиген-вільній формі G6.31_{LC-F83A}, яка ближче до тієї, яка спостерігається в структурі G6_{VEGF}. Аби не допустити зв'язування себе теорією, перегрупований інтерфейс зв'язування антигену G6.31_{LC-F83A} може призвести до зниження енергетичної вартості для зв'язування VEGF і, отже, до спостережуваного збільшення афінності (зменшення Kd) G6.31_{LC-F83A}. Крім того, імовірно краща упаковка інтерфейсу VH-VL в G6.31_{LC-F83A} може забезпечити альтернативний або додатковий механізм стабілізації складок (див., наприклад, Rothlisberger et al., J. Mol. Biol. 347 (4): 773-789 (2005)), щоб пояснити видиме збільшення T_m.

55 Матеріали і способи

Структурний аналіз і моделювання молекулярної динаміки проводили, як описано в прикладах 3-5.

Приклад 7: Мас-спектрометрія з обміном водню і дейтерієм (HDX-MS) підтверджує конформаційні зміни в інтерфейсі з постійною змінною, а також в антигензв'язуючій ділянці в G6.31_{F83A} в порівнянні з G6.31.

HDX-MS використовували для демонстрації того, що зміни в міждоменній динаміці молекули Fab через мутації LC-F83A, описані в прикладах 3-6, можна спостерігати в розчині. HDX-MS вимірює коефіцієнт обмінювання атомів водню остова амідів з дейтерієм. Атоми водню амідного остова зазвичай обмінюються швидше, якщо вони піддаються впливу розчинників і не беруть участь в утворенні водневих зв'язків в порівнянні з тим, коли вони занурені і/або беруть участь в утворенні водневих зв'язків. У декількох ділянках показані відмінності, коли модель обміну водень-дейтерій G6.31 порівнюється з G6.31_{LC-F83A} (фіг.9D). DE-петля домену CL, який формує інтерфейс VL-CL і знаходиться в безпосередній близькості від мутації LC-F83A, обмінюючись повільніше в G6.31_{LC-F83A} в порівнянні з G6.31. Спостерігалися також зміни коефіцієнта обміну петель HVR і сусідніх ділянок. Петлі HVR H1 і L2 обмінювалися повільніше в G6.31_{LC-F83A} в порівнянні з G6.31, тоді як сусідні ділянки петель HVR-H3, які знаходяться в інтерфейсі VH-VL, обмінювалися швидше. Петлі HVR-L2 і HVR-H3 є частиною інтерфейсу VH-VL (див., наприклад, Vargas-Madrado et al., *Journal of Molecular Recognition* 16 (3): 113-120 (2003), Aburatani et al., *J. Biochem.* 132(5):775-782 (2002); Padlan, *Molecular Immunology* 31(3):169-217 (1994)). Тому зміни в схемі обміну, спостерігаються в HVR та інтерфейсі VL-CL в HDX-MS між G6.31 і G6.31_{LC-F83A}, незалежно підтвердили результати, отримані в результаті структурного аналізу та імітування молекулярної динаміки.

Матеріали і способи

Зразки мутанта G6.31 ДТ і F83A (45 мкМ) розбавляли в 15 разів в 20 мМ гістидин-ацетатного буфера при рD 7,0 і 50 мМ NaCl з вмістом D₂O > 90 % для початку реакції мічення при 20 °C. При шести інтервалах часу з логарифмічним інтервалом, що становить від 30 секунд до 1000

хвилин, реакцію мічення гасили шляхом зниження рН (рН 2,5) і додавання 2 М хлориду гуанідинію (GdmCl) і 0,25 М трис (2-карбоксіетіл)фосфіну (TCEP) до ін'єкції в холодну онлайн-систему (див., наприклад, Mayne et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22(11):1898-1905, 2011). Якщо коротко, погашенні зразки спочатку пропускали через колонку імобілізованого пепсину (2,1 × 30 мм, Applied Biosystems) при 0 °C для протеолізу і потім зв'язували з колоною-пасткою для знесолення (ACQUITY VANGUARD™ C8) перед відділенням хроматографією з оберненою фазою (ACQUITY UPLC® BEH C18, розмір часток 1,7 мкм, 1,0 × 50 мм) і вводиться в мас-спектрометр (Thermo ORBITRAP ELITE™, розширення 120 кГц при m/z 400) для вимірювання вмісту дейтерію. Хроматографічні рухливі фази отримували, як описано раніше (Walters et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23 (12): 2132-2139, 2012) з рН 2,25 для максимізації відновлення дейтерію, який становив в середньому 82 % шляхом вимірювання повністю дейтерованих контролів. Експерименти з мутантом і диким типом були тими, що чергуються, а рандомізовані часові точки були зібрані в трьох примірниках; весь процес було автоматизовано робототехнічною платформою LEAPv1 (Leap Technologies, Каррборо, Північна Кароліна), яка виконувала всі етапи обробки зразків. Цей процес призвів до 152 унікальним пептидів, послідовно ідентифікованим програмою ExMS (Kan et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (11): 1906-1915, 2011) як для зразків дикого типу, так і для мутантів, забезпечуючи покриття порядку приблизно 95 %. Аналіз змісту дейтерію включав використання раніше описаних користувальницьких сценаріїв python (Kan et al., вище, Walters et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(47):18898-18903, 2013; і Hu et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (19): 7684-7689, 2013), і суттєві відмінності в рівнях поглинання дейтерію між диким типом і мутантом були ідентифіковані за допомогою t-критерію Ст'юдента як ті, що мають р-значення < 0,05, описане раніше для експериментів HDX-MS (Leurs et al. *Anal. Chem.* 86(23):11734-11741, 2014).

Приклад 8: Соматична гіпермутаційна мішень LC-83 і LC-106 в антитілах людини

Положення LC-83 розташоване поблизу мотиву гарячої точки AID (RGYW, де R являє собою пурин, Y являє собою піримідин, а W являє собою A або T) в гені легкого ланцюга зародкової лінії IGKV1-39. Збільшення термостабільності, викликане мутацією LC-F83A, можна було переносити на інші антитіла, які походять з тих же зародкових ліній, що і G6.31. Тому була оцінена частота соматичних мутацій в положенні LC-83 в людських антитілах. Крім того, LC-106 також був включений в цей аналіз.

Для вивчення розподілу соматичної гіпермутації (SHM) були використані два підходи в послідовностях легкого ланцюга, що походять з зародкових ліній IGKV1. Першим було зіставлення соматичних мутацій 4623 унікальних людських послідовностей легкого ланцюга IGKV1, доступних в декількох загальнодоступних базах даних (фіг. 10A, верхня вставка). По-друге, шляхом ампліфікації послідовностей IGKV1 з РНК, що походять з більш ніж 1000 окремих людських лімфоїдних тканин, за якими слідує високоточне одномолекулярного сіквенування в

реальному часі (SMRT) і порівняння SHM. Незважаючи на різне походження двох наборів даних, спостерігався дуже схожий розподіл соматичних мутацій (фіг. 10A-10C). LC-83 є однією з найбільш часто мутованих позицій в сегменті VL; 7 % і 19 % всіх послідовностей IGKV1 переносять мутацію в LC-83 в двох наборах даних, відповідно. Цікаво, що положення LC-106 також часто мутувалося в послідовності IGKV1 (9 % і 20 % відповідно), а найбільш поширеною мутацією є валін. Найближчими сегментами гена зародкової лінії для G6 VL є IGKV1-39 і IGJ1. Таким чином, були досліджені антитіла до джерела зародкової лінії IGKV1.39, які показали, що соматичні мутації у LC-F83 в основному призводять до менших бічних ланцюгів (включаючи серин, валін і лейцин) (фіг.10A-10C). Аланінові заміни в антитілі IGKV1.39 не спостерігалися, ймовірно, через те, що мутація аланіна потребувала б заміни на дві основи в кодоні в LC-F83, які рідко зустрічаються.

Потім були отримані варіанти Fab G6.31, що несуть найбільш часті соматичні мутації для положення LC-83 і LC-106, і їх вплив на зв'язування і термостабільність антигену було визначено (фіг. 10D). Всі варіанти одиночної мутації збільшили T_m на 4,8 °C до 6 °C, імовірно, зменшивши кут вигину Fab і збільшивши площу інтерфейсу VL-CL. Закономірно, подвійна мутація LC-F83A/LC-106V не призвела до значного збільшення T_m . Аби не допустити пов'язувати себе теорією, одночасне зменшення розміру обох бічних ланцюгів залишало б порожнечу в гідрофобній порожнині, зазвичай займану LC-F83 або LC-106, і зменшувала здатність VL стабільно упаковувати проти CL. Вплив мутації LC-83 на афінність VEGF є змішаним. LC-F83V призводить до 3-кратного збільшення афінності, аналогічного LC-F83A, тоді як мутації LC-F83S і LC-106V майже не збільшують афінність. Вплив мутації LC-83 на афінність антигену може бути залежним від контексту. Мутації LC-F83A вводили в інше антитіло, що походить з тієї ж зародкової лінії, що і G6.31, і спостерігалось подібне збільшення термостабільності і афінності. Крім того, повідомлялося, що мутація LC-F83S збільшує афінність анти-естрадіального антитіла.

Таким чином, LC-83 і LC-106 часто мутують в людських антитілі. З огляду на вплив цих двох позицій на афінність і стабільність, оптимізація загальної динаміки домену Fab є молекулярним механізмом, який може бути використаний під час дозрівання афінності антитілі *in vivo*.

Матеріали і способи

Послідовності легкого ланцюга людини були отримані з різних загальнодоступних джерел: Absis (доступне на сайті bioinf.org.uk/abysis), база даних Кабат (Martin, Proteins 25 (1): 130-133 (1996)), база даних IMGT (Lefranc, Molecular Biotechnology 40 (1): 101-111 (2008)), GenBank (Benson et al., Nucleic Acids Research 43: D30-35 (2015)) і Банк білкових структур (Berman et al., Nucleic Acids Research, 28 (1): 235-242 (2000)). Дубльовані послідовності видаляли, а найближчі гени зародкової лінії були призначені для відповідних V-сегментів з використанням IGBlast (Ye et al., Nucleic Acids Research 41: W34-40 (2013)). Послідовності, для яких була призначена зародкова лінія миші або щура, були видалені з набору даних. Послідовності були пронумеровані по Кабат (див., наприклад, Wu et al., J. Exp. Med. 132 (2): 211-250 (1970)) і були ідентифіковані соматичні мутації в каркасі V-сегмента. Мутації в ділянках HVR (як визначено схемою нумерації по Кабат) в цьому аналізі не розглядалися.

Друге джерело послідовностей антитілі людини був отриманий з комерційно доступною РНК з людських селезінки, мигдаликів, кісткового мозку і лімфоцитів периферичної крові, отриманих від 1088 індивідумів (Clonetechn and Amsbio). РНК спочатку транскрибували в кДНК з використанням набору для ампліфікації кДНК SMARTER® RACE (Clonetechn). IGKV-специфічну ДНК ампліфікували з використанням 5'RACE (Advantage 2 ПЛР Набір, Clonetechn) зі звичайним праймером, який відпалює 5'-ділянку ділянки IGKC (5'-CATCAGATGGCGGGAAGATGAAGACAGATGGTGC-3' (SEQ ID NO: 56)), тоді як IGKV1 сегменти були збагачені в другій стадії ПЛР з використанням праймерів: вперед: 5'-GCCATCCAGATGACCCAGTCTCC-3' (SEQ ID NO: 57) і назад: 5'-GGCTGCACCATCTGTCTTC-3' (SEQ ID NO: 58). Продукт ПЛР очищували в гелі і сіквенували з використанням Pacific Bioscience RSII (EA Genomic Services). Отримано загально 994,8 Мб. Консенсусна послідовність кожного читання була створена з використанням програмного пакета Pacific Bioscience SMRT Analysis 2.3. Анотацію зародкової лінії консенсусних послідовностей проводили з використанням VDJFasta (Glanville et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(48):20216-20221). Послідовності були пронумеровані по Кабат і ідентифіковані соматичні мутації в каркасі V-сегмента. В цілому 19034 послідовностей були анотовані як IGKV1, з яких 3796 містили щонайменше три каркасні ділянки і два HVR і були включені для генерації SHM-розподілів.

Приклад 9: Ідентифікація варіантів поверхневого заряду G6.31

Для виділення мутацій, які можна було б використовувати для зниження pI G6.31, розташовані на поверхні позиції були ідентифіковані в варіабельних доменах з використанням структурної

інформації з кристалічної структури G6.Позиції, для яких заміщення глутаматом показало коефіцієнт збагачення 1 або більше, заснований на пенінгу VEGF в бібліотеках проходження NNK VH і VL (приклад 2), були обрані для перевірки їх впливу на афінність зв'язування VEGF за допомогою одного циклу кінетичного аналізу з використанням BIACORE® T200 системи і термостабільності (DSF) (таблиця 3А). Варіанти мутантів, що містять заміни до глутамату, а також інші заряджені залишки (наприклад, аргінін, лізин), були отримані, експресовані і очищені, як описано вище (див. Приклад 2, "Матеріали і способи"). Зверніть увагу, що в деяких випадках загальний Kd, наведений в таблиці 3А для деяких варіантів, слабкіше в порівнянні з результатами в таблиці 4 через відмінності в підгонці між одним циклом кінетичного аналізу (таблиця 3А) і множинним циклом кінетичного аналізу (таблиця 4). У таблиці 3В показаний вихід, відсоток мономера (% мономера) і час елюювання для зазначених варіантів.

Таблиця 3А

Характеристика варіантів з розташованою на поверхні полярною амінокислотою

Варіант	k _{on} (1/Мс)	k _{off} (1/с)	Kd (М)	Кратність зміни (відносно G6.31)	T _m
G6.31 (ДТ)	3,01E+05	5,13E-04	1,7E-09	--	83,8
LC-S7E	3,56E+05	4,43E-04	1,24E-09	1,4	85,8
LC-S9E	1,24E+06	4,57E-04	3,68E-10	4,6	85,4
LC-S10E	2,63E+05	4,29E-04	1,63E-09	1,0	86
LC-S12E	2,01E+05	4,58E-04	2,27E-09	0,7	84
LC-A13E	4,83E+05	3,94E-04	8,17E-10	2,1	79,2
LC-T20E	2,46E+05	4,57E-04	1,86E-09	0,9	84,6
LC-Q27E	2,30E+05	4,50E-04	1,96E-09	0,9	84,6
LC-P40E	3,03E+04	5,41E-04	1,79E-08	0,1	83
LC-A51E	1,72E+05	4,62E-04	2,68E-09	0,6	76,8
LC-Y55E	4,53E+04	5,31E-04	1,17E-08	0,1	80,8
LC-G57E	4,29E+05	4,18E-04	9,74E-10	1,7	83
LC-P59E	2,84E+05	4,44E-04	1,56E-09	1,1	82,8
LC-S77E	7,11E+05	3,99E-04	5,62E-10	3,0	84,6
LC-Y92E	4,97E+05	1,03E-03	2,07E-09	0,8	80
LC-G93E	2,48E+05	1,49E-03	5,98E-09	0,3	76,2
LC-A13R	3,25E+05	4,58E-04	1,41E-09	1,2	81,6
LC-G16K	3,11E+05	4,46E-04	1,43E-09	1,2	79,6
LC-S50R	2,45E+05	4,64E-04	1,89E-09	0,9	84
LC-T31R	2,71E+05	4,89E-04	1,80E-09	0,9	84
LC-T72R	2,92E+05	4,46E-04	1,53E-09	1,1	84,4
HC-V2E	3,00E+05	3,95E-04	1,32E-09	1,3	83,4
HC-S5E	7,88E+05	4,54E-04	5,76E-10	3,0	84
HC-S7E	7,61E+05	3,81E-04	5,01E-10	3,4	85,2
HC-G8E	6,57E+05	4,55E-04	6,93E-10	2,5	83,4
HC-L11E	5,63E+05	5,07E-04	9,01E-10	1,9	82
HC-G16E	7,30E+05	4,54E-04	6,22E-10	2,7	83,2
HC-T28E	6,21E+05	3,52E-04	5,66E-10	3,0	85,2
HC-S30E	7,85E+04	5,58E-04	7,1E-09	0,2	84
HC-A40E	1,97E+05	5,17E-04	2,63E-09	0,6	83,8

Таблиця 3А

Характеристика варіантів з розташованою на поверхні полярною амінокислотою

Варіант	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_d (М)	Кратність зміни (відносно G6.31)	T_m
HC-P41E	1,52E+05	5,48E-04	3,6E-09	0,5	84,4
HC-K43E	3,80E+05	4,82E-04	1,27E-09	1,3	84,2
HC-Y58E	8,20E+05	5,08E-04	6,2E-10	2,7	84
HC-A60E	5,24E+05	5,65E-04	1,08E-09	1,6	83,2
HC-K64E	5,52E+05	3,95E-04	7,15E-10	2,4	84
HC-G65E	3,02E+05	4,72E-04	1,56E-09	1,1	84,2
HC-T68E	2,15E+05	4,40E-04	2,05E-09	0,8	84,8
HC-A71E	2,57E+05	3,79E-04	1,48E-09	1,1	84,8
HC-T73E	5,50E+05	4,34E-04	7,88E-10	2,2	84,6
HC-S74E	2,36E+05	4,99E-04	2,11E-09	0,8	84,4
HC-K75E	2,17E+05	4,44E-04	2,04E-09	0,8	84,2
HC-N76E	2,71E+05	4,67E-04	1,72E-09	1,0	81,4
HC-T77E	2,48E+05	4,77E-04	1,93E-09	0,9	84,8
HC-Q81E	2,25E+05	4,95E-04	2,2E-09	0,8	85
HC-S82bE	4,37E+05	4,33E-04	9,91E-10	1,7	84,2
HC-Q105E	1,09E+05	4,63E-04	4,24E-09	0,4	84,6
HC-T107E	4,16E+05	5,94E-04	1,43E-09	1,2	85,8
HC-L11R	8,90E+05	4,35E-04	4,88E-10	3,5	81,4
HC-T28K	9,75E+05	4,10E-04	4,20E-10	4,0	85,4
HC-P41R	5,71E+05	5,54E-04	9,70E-10	1,8	84,6
HC-Y56K	7,24E+05	6,99E-04	9,65E-10	1,8	84,8
HC-T68K	3,97E+05	5,13E-04	1,29E-09	1,3	84,6
HC-T77K	2,03E+06	4,50E-04	2,22E-10	7,7	84

Таблиця 3В

Параметри очищення для варіантів з розташованою на поверхні полярною амінокислотою

Варіант	Вихід (мг)	% Мономер	Час елюювання (хв.)
G6.31 (ДТ)	0,57	97,86	12,74
LC-S7E	0,24	77,02	12,39
LC-S9E	0,32	77,19	12,43
LC-S10E	0,05	54,64	12,44
LC-S12E	0,28	74,57	12,41
LC-A13E	0,31	67,58	12,4
LC-T20E	0,32	73,31	12,36
LC-Q27E	0,26	78,98	12,19
LC-P40E	0,34	67,56	12,43
LC-A51E	0,31	67,73	12,28

Таблиця 3В

Параметри очищення для варіантів з розташованою на поверхні полярною амінокислотою

Варіант	Вихід (мг)	% Мономер	Час елюювання (хв.)
LC-Y55E	0,3	68,83	12,42
LC-G57E	0,3	67,9	12,28
LC-P59E	0,35	71,85	12,41
LC-S77E	0,36	73,49	12,37
LC-Y92E	0,31	100	12,2
LC-G93E	0,3	100	12,55
LC-A13R	0,35	70,15	12,41
LC-G16K	0,32	72,84	12,36
LC-S50R	0,33	100	12,13
LC-T31R	0,34	74,87	12,49
LC-T72R	0,28	72,31	12,41
HC-V2E	0,3	97,45	12,32
HC-S5E	0,36	97,14	12,44
HC-S7E	0,32	100	12,5
HC-G8E	0,33	100	12,36
HC-L11E	0,33	100	12,48
HC-G16E	0,36	100	12,46
HC-T28E	0,29	97,52	12,08
HC-S30E	0,36	94,81	11,9
HC-A40E	0,34	95,91	12,41
HC-P41E	0,38	100	12,62
HC-K43E	0,36	100	12,54
HC-Y58E	0,37	100	11,97
HC-A60E	0,27	97,58	12,39
HC-K64E	0,31	97,83	12,36
HC-G65E	0,32	98,01	12,41
HC-T68E	0,35	100	12,41
HC-A71E	0,42	100	12,53
HC-T73E	0,37	100	12,14
HC-S74E	0,36	100	12,36
HC-K75E	0,27	94,47	12,38
HC-N76E	0,37	95,68	12,02
HC-T77E	0,41	97,5	12,51
HC-Q81E	0,33	97,72	12,49
HC-S82bE	0,4	93,54	12,47
HC-Q105E	0,37	98,41	12,55
HC-T107E	0,32	98,04	12,23
HC-L11R	0,37	99,81	12,53
HC-T28K	0,39	97,98	12,43

Таблиця 3В

Параметри очищення для варіантів з розташованою на поверхні полярною амінокислотою

Варіант	Вихід (мг)	% Мономер	Час елюювання (хв.)
HC-P41R	0,34	100	12,6
HC-Y56K	0,39	100	12,13
HC-T68K	0,42	100	12,39
HC-T77K	0,33	94,64	12,51

Як показано в таблиці 3А, було ідентифіковано кілька варіантів зарядів з поверхневим розташуванням, які мали яку можна порівняти або поліпшену афінність зв'язування з VEGF в порівнянні з G6.31.

5 Приклад 10: Генерація та характеристика комбінованих варіантів з поліпшеною афінністю зв'язування з VEGF і поліпшеною стабільністю

А. Генерація варіантів з поліпшеною афінністю зв'язування з VEGF і поліпшеною стабільністю G6.31 містить сайт саморозщеплення в HVR-L3 (N94-P95), який може вплинути на його стабільність. Комбінації окремих варіантів, описаних в прикладі 2 (див., наприклад, таблиця 2), об'єднували для ідентифікації клонів з підвищеною афінністю зв'язування і підвищеною стабільністю. Чотири мутації, зокрема, були зосереджені на: LC-F83A (забезпечує поліпшену термостабільність і спорідненість), LC-N94A (видаляє сайт саморозщеплення), HC-Y58R (покрощує афінність) і HC-N82aR (покрощує афінність). Було також перевірено кілька інших заміщень в положенні LC-N94, призначених для видалення сайту саморозщеплення, для їх впливу на афінність зв'язування з VEGF за допомогою декількох циклів кінетичного вимірювання, а також на стабільність за допомогою DSF (таблиця 4). Видалення сайту саморозщеплення послідовно зменшувало фрагментацію, як оцінювали за відсотком об'єктів з низькою молекулярною масою, що визначаються з використанням капілярного електрофорезу додецилсульфата натрію в невідновлювальних умовах (CE-SDS) (fig.12).

20

Таблиця 4

Афінність і термостабільність варіантів сайту саморозщеплення

Варіант	K_{on} (1/Мс)	K_{off} (1/с)	K_d (нМ)	$T_m(^{\circ}C)$	Збільшення T_m (відносно до ДТ)
G6.31 ДТ	7,54E+05	3,95E-04	0,525	84	--
LC-N94A	1,59E+06	1,69E-03	1,06	85,6	1,6 °C
LC-N94Q	3,18E+05	3,62E-04	1,14	84,6	0,6 °C
LC-N94R	1,94E+05	4,07E-04	2,09	85,2	1,2 °C

Комбінація варіантів LC-F83A, LC-N94A, HC-Y58R і HC-N82aR в один клон ("Y58R.N94A.N82aR.F83A", також званий "G6.31 AARR") призвела до значно підвищеної афінності зв'язування для VEGF ($K_d=80$ нМ), що в 6,6 разів вище в порівнянні з G6.31. Y58R.N94A.N82aR.F83A також мав помітно поліпшену термостабільність у порівнянні з G6.31 зі збільшенням T_m на 4,8 °C. (Таблиця 5). Амінокислотна послідовність VH-домену Y58R.N94A.N82aR.F83A показана в SEQ ID NO: 11, і амінокислотна послідовність домену VL показана в SEQ ID NO: 12.

30

Таблиця 5

Комбінований варіант Y58R.N94A.N82aR.F83A має поліпшену афінність зв'язування з VEGF і поліпшену стабільність в порівнянні з G6.31

Варіант	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_d (нМ)	Покра- щене згортання (відносно до ДТ)	T_m (°C)	Збільше- ння T_m (відносно до ДТ)
G6.31 ДТ	7,54E+05	3,95E-04	0,525	--	84,0	--
LC-F83A	1,65E+06	2,18E-04	0,132	4,0	89,0	5,0 °C
LC-N94A	1,59E+06	1,69E-03	1,06	0,5	85,6	1,6 °C
HC-Y58R	2,42E+06	1,84E-04	0,076	6,9	83,2	0,8 °C
HC-N82aR	1,62E+06	1,24E-04	0,077	6,8	84,0	0,0 °C
Y58R.N94A.N82aR.F83A	4,00E+06	3,20E-04	0,080	6,6	88,8	4,8 °C
Y58R.N94A.F83A	2,22E+06	3,01E-04	0,135	3,9	89,2	5,2 °C

В. Генерація варіантів з розташованою на поверхні полярною амінокислотою зі змінним рІ
 Для генерації варіантів з більш низьким рІ, в послідовність G6.31 вводили кілька глутаматних
 5 заміщень. На основі даних про одиничну мутацію варіанту з розташованою на поверхні
 полярною амінокислотою (Таблиці 3А-3В) варіанти, які не чинили великого негативного впливу
 на зв'язування VEGF, були відібрані для подальшого конструювання. Рівень експресії
 (оцінюваний по врожайності) і зменшена агрегація (відповідно до високого % мономера) також
 враховувалися при виборі мутацій. Ізо-електростатичну поверхню G6.31 розраховували з
 10 використанням APBS (Baker et al. Proc Natl. Acad. Sci. USA 98(18):10037-10041 (2001)). Обрані
 глутаматні мутації були відображені на електростатичній поверхні, і були обрані комбінації
 мутацій глутамату, які (i) уникали мутацій, які були розташовані просторово близько один до
 одного, і (ii), які сприяли мутаціям, які перебували в сильній позитивно-зарядженій плямі. Для
 15 подальшої характеристики були створені два варіанти комбінації важких ланцюгів (з R19E і без
 них) і п'ять варіантів комбінації легкого ланцюга (таблиця 6). Всі варіанти комбінації легкого
 ланцюга містили мутацію LC-N94A для видалення сайту саморозщеплення і мутації LC-F83A
 для поліпшення термостабільності антитіла. Деякі з варіантів показали поліпшену афінність до
 VEGF (див. Таблицю 6, Таблицю 7 і Таблицю 9). Наприклад, HCLC2 і HCLC5 показали
 20 поліпшену афінність і помітно зменшений рІ в порівнянні з G6.31 (рІ 5,3 і 5,6 відповідно, в
 порівнянні з рІ 8,9 для G6.31) (див. Таблицю 7 і Таблицю 9).

Таблиця 6

Комбінація варіантів з розташованою на поверхні полярною амінокислотою

Варіант	Тип	SEQ ID NO:	Мутації
HCcombo	VH	33	V2E, S7E, R19E, T28E, A40E, G16E, K43E, T57E, K64E, K75E, S82BE, T107E
R19HCcombo	VH	51	V2E, S7E, T28E, A40E, G16E, K43E, T57E, K64E, K75E, S82BE, T107E
LCcombo1	VL	34	S9E, R18E, F83A, N94A
LCcombo2	VL	35	R18E, K42E, S76E, F83A, N94A
LCcombo3	VL	36	S9E, R18E, K42E, F83A, N94A
LCcombo4	VL	37	R18E, F83A, N94A
LCcombo5	VL	12	F83A, N94A

Таблиця 7

Кінетика зв'язування поєднання варіантів з розташованою на поверхні полярною амінокислотою з VEGF

Назва антитіла	K_{on} (1/Mc)	K_{off} (1/c)	K_d (M)	VH	VL
HCcombo	2,05E+06	2,74E-04	1,34E-10	HCcombo	G6.31 ДТ
HCLC2	2,12E+06	6,23E-04	2,93E-10	HCcombo	LCcombo2
HCLC4	2,03E+06	6,08E-04	2,99E-10	HCcombo	LCcombo4
HCLC5	1,81E+06	5,73E-04	3,16E-10	HCcombo	LCcombo5
HCLC3	1,84E+06	6,08E-04	3,30E-10	HCcombo	LCcombo3
HCLC1	1,37E+06	6,07E-04	4,42E-10	HCcombo	LCcombo1
G6.31 ДТ	9,99E+05	5,99E-04	5,99E-10	G6.31 ДТ	G6.31 ДТ
LCcombo2	5,99E+05	6,67E-04	1,11E-09	G6.31 ДТ	LCcombo2
LCcombo3	5,74E+05	7,68E-04	1,34E-09	G6.31 ДТ	LCcombo3
LCcombo5	5,37E+05	7,66E-04	1,43E-09	G6.31 ДТ	LCcombo5
LCcombo4	4,63E+05	8,08E-04	1,75E-09	G6.31 ДТ	LCcombo4
LCcombo1	4,47E+05	1,01E-03	2,27E-09	G6.31 ДТ	LCcombo1
R19HCLC2	8,89E+05	4,67E-05	9,49E-11	R19HCcombo	LCcombo2
R19HCLC4	2,84E+05	4,79E-05	1,69E-10	R19HCcombo	LCcombo4
R19HCLC5	7,07E+05	4,41E-05	6,24E-11	R19HCcombo	LCcombo5

- 5 Крім того, було створено кілька інших варіантів поєднання, які включали обрані поверхнево-розташовані заміни глутамату і окремі варіанти, які покращували афінність і/або стабільність (таблиця 8).

Таблиця 8

Кінетика зв'язування додаткових варіантів поєднання

Варіанти	K_{on} (1/Mc)	K_{off} (1/c)	K_d (M)
HC-A40E, HC-T57E	2,96E+06	8,04E-04	2,72E-10
LC-F83A, LC-N94A	6,48E+05	1,11E-03	1,71E-9
LC-F83A, LC-N94A, LC-T22D	1,33E+06	7,44E-04	5,58E-10
HC-A40E, HC-T57E LC-F83A, LC-N94A	1,27E+06	7,41E-04	5,84E-10
HC-A40E, HC-T57E, LC-F83A, LC-N94A, LC-T22D	1,20E+06	7,18E-04	5,97E-10

- 10 Таблиця 9 показує резюме афінності зв'язування, стабільності і даних рІ для обраних варіантів комбінації. Антитіло рІ розраховували з використанням власної програми і шляхом запуску гелю ізоелектричного фокусування (IEF) зі стандартним контролем рІ. У таблиці 10 наведені відповідні амінокислотні послідовності VH і VL для цих антитіл. У таблиці 11 показані амінокислотні послідовності VL HVR для цих антитіл. У таблиці 12 показані амінокислотні послідовності VH HVR для цих антитіл.

Таблиця 9

Резюме обраних варіантів поєднання

Назва антитіла	K_{on} (1/Мс)	K_{off} (1/с)	K_d (нМ)	Fab T _m (°C)	pI
G6.31	7,54E+05	3,95E-04	0,525	83,8	8,9
LC-N94A	1,56E+06	1,69E-03	1,060	85,8	8,9
LC-N94A.LC-F83A	6,48E+05	1,11E-03	1,710	88	8,9
LC-N94A.LC-F83A HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	1,27E+06	7,41E-04	0,580	88	8,5
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	2,22E+06	3,01E-04	0,135	88,2	9,3
HCcombo	2,05E+06	2,74E-04	0,134	71,2	5,6
HCLC2	2,12E+06	6,23E-04	0,293	72,6	5,3
HCLC4	2,03E+06	6,08E-04	0,299	73,4	5,4
HCLC5	1,81E+06	5,73E-04	0,316	73,8	5,6
HCLC3	1,84E+06	6,08E-04	0,330	73,8	5,3
HCLC1	1,37E+06	6,07E-04	0,442	73,6	5,4
R19HCLC2	8,89E+05	4,67E-05	0,095	74,8	5,7
R19HCLC4	2,84E+05	4,79E-05	0,169	76,2	5,8
R19HCLC5	7,07E+05	4,41E-05	0,062	76,2	6

Таблиця 10

VH і VL амінокислотні послідовності для антитіл з таблиці 9

Назва антитіла	Варіант VH (SEQ ID NO)	Варіант VL (SEQ ID NO)
G6.31 ДТ	G6.31 ДТ (SEQ ID NO: 42)	G6.31 ДТ (SEQ ID NO: 38)
LC-N94A	G6.31 ДТ (SEQ ID NO: 42)	N94A (SEQ ID NO: 41)
LC-N94A.LC-F83A	G6.31 ДТ (SEQ ID NO: 42)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
LC-N94A.LC-F83A HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	A40E.T57E (SEQ ID NO: 40)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	N82aR.Y58R (SEQ ID NO: 11)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
HCcombo	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	G6.31 ДТ (SEQ ID NO: 38)
HCLC2	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo2 (SEQ ID NO: 35)
HCLC4	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo4 (SEQ ID NO: 37)
HCLC5	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
HCLC3	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo3 (SEQ ID NO: 36)
HCLC1	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo1 (SEQ ID NO: 34)
R19HCcombo	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	G6.31 ДТ (SEQ ID NO: 38)
R19HCLC2	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	LCcombo2 (SEQ ID NO: 35)
R19HCLC4	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	LCcombo4 (SEQ ID NO: 37)
R19HCLC5	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)

Таблиця 11

Послідовності VL HVR для антитіл з таблиці 9

Назва антитіла	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
G6.31 ДТ	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23)
LC-N94A	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
LC-N94A.LC-F83A	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
LC-N94A.LC-F83A HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCcombo	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23)
HCLC2	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCLC4	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCLC5	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCLC3	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCLC1	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
R19HCcombo	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23)
R19HCLC2	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
R19HCLC4	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
R19HCLC5	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)

Таблиця 12

Послідовності VH HVR для антитіл з таблиці 9

Назва антитіла	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3
G6.31 ДТ	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYTYADSVKG (SEQ ID NO: 53)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
LC-N94A	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYTYADSVKG (SEQ ID NO: 53)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
LC-N94A.LC-F83A	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYTYADSVKG (SEQ ID NO: 53)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
LC-N94A.LC-F83A HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYADSVKG (SEQ ID NO: 21)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
HCcombo	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
HCLC2	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)

Послідовності VH HVR для антитіл з таблиці 9

Назва антитіла	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3
HCLC4	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
HCLC5	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
HCLC3	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
HCLC1	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
R19HCcombo	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
R19HCLC2	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
R19HCLC4	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
R19HCLC5	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)

Верхню шарнірну ділянку важкого ланцюга Fab будь-якого з перерахованих вище антитіл, наприклад, G6.31 AARR, може бути мutowано для видалення реакційної здатності з шарніром анти-IgG1 аутоантитіл, про які повідомлялося в літературі. Див., наприклад, Brezski et al., J. Immunol. 181:3183-3192, 2008 і Brezski et al., mAbs 2:3, 212-220, 2010. Таким чином, С-кінцева амінокислота важкого ланцюга G6.31 AARR може бути або Т (версія дикого типу (ДТ)), або L (варіант, який не володіє реакційною здатністю до Fab анти-людського IgG). Повнорозмірна амінокислотна послідовність важкого ланцюга дикого типу G6.31 AARR являє собою SEQ ID NO: 48. Повнорозмірна амінокислотна послідовність важкого ланцюга версії варіанту, яка не володіє реакційною здатністю до Fab анти-людського IgG, являє собою SEQ ID NO: 49. Повнорозмірна амінокислотна послідовність легкого ланцюга як для G6.31 AARR, так і для версії варіанту, який не володіє реакційною здатністю до Fab анти-людського IgG, являє собою SEQ ID NO: 50.

Таким чином, комбінації варіантів, ідентифікованих методом глибокого скануючого мутагенезу, призводили до антитіл з покращеними властивостями. У деяких випадках антитіла мали поліпшену афінність зв'язування з VEGF, а також поліпшену стабільність (про що можна судити по помітно збільшеному T_m) в порівнянні з G6.31. Деякі з варіантів (наприклад, антитіла HCcombo, HCLC1, HCLC2, HCLC3, HCLC4 і HCLC5) мали як поліпшену афінність зв'язування з VEGF, так і помітно зменшену pI . Для варіантів зі зменшеною pI , повернення мутації R19E у важкого ланцюга назад до вихідного аргініну в положенні 19 (наприклад, як в R19HCcombo, R19HCLC2, R19HCLC4 і R19HCLC5), призводило до варіантів з подальшим поліпшенням афінності і збільшенням T_m (на близько 2,2-2,8 °C).

Приклад 11: Окулярна і системна фармакокінетика варіантів G6.31 після інтравітреального введення у кроликів

Для оцінки фармакокінетичних (ФК) властивостей варіантів G6.31 in vivo було проведено наступний експеримент з використанням новозеландських білих (NZW) кроликів. Період очулярного напіввиведення визначали для двох різних варіантів G6.31, G6.31 AAEE (LC-N94A.LC-F83A.HC-A40E.HC-T57E) і G6.31 AARR (Y58R.N94A.N82aR.F83A), а також батьківського G6.31 ДТ. У кожному випадку Fab кожного з антитіл складали в PBS в концентрації 10 мг/мл. 50 мкл (0,5 мг) вводили внутрішньовенно анестезованим кроликам. Кролики (в групах по 10) дозувалися один раз/око. Групі 1 вводили G6.31 AAEE, групі 2 вводили G6.31 ДТ, а групі 3 вводили G6.31 AARR. Тканини (склоподібне тіло, внутрішньоочна рідина і сироватка) збирали перед введенням дози, через 2 години, 6 годин, 1 день, 2 дні, 4 дні, 8 днів, 15 днів і 21 день після прийому. Зразки аналізували на рівні анти-VEGF з використанням Загального ІФА Fab, описаного нижче.

Результати фармакокінетичного аналізу кожного варіанту і ДТ в кожному зі склоподібного тіла і внутрішньоочної рідини представлені на Фіг.11А. Результати показують, що ФК G6.31 AAEE і G6.31 AARR по суті такі ж, як ФК для ДТ G6.31 як в склоподібному тілі, так і у внутрішньоочній рідині. Були розраховані склоподібний і рідинний періоди напіввиведення, і ці результати представлено в таблиці 13 нижче. Період напіввиведення варіанти G6.31 Fab був схожий з ДТ,

а також відповідав періоду очулярного напіввиведення Fab, про який повідомлялося в літературі.

Таблиця 13

Період напіввиведення варіантів G6.31 і G6.31 ДТ

Антитіло	Склоподібний період напіввиведення (дні)	Рідинний період напіввиведення (дні)
G6.31 AAEE	3,13	3,02
G6.31 ДТ	3,23	3,03
G6.31 AARR	3,1	2,81

5

Системний вплив Fab після інтравітреальної ін'єкції оцінювали шляхом вимірювання рівнів анти-VEGF в сироватці. Зразки сироватки аналізували для анти-VEGF. Результати показані на фіг.11В. Кліренс був обчислений (мл/кг/день), і ці результати показані в таблиці 14 нижче. Сироватку також аналізували на антитерапевтичні антитіла (АТА). АТА був присутній у всіх тварин з 14-го дня.

10

Таблиця 14

Кліренс варіантів G6.31 і G6.31 ДТ

Антитіло	Кліренс (мл/кг/день)
G6.31 AAEE	733
G6.31 ДТ	1238
G6.31 AARR	2133

Як показують результати, показані в таблиці 14, якщо всі три Fab мають однакову біодоступність, то G6.31 AARR мав найшвидший кліренс, що вказує на більш низький системний вплив в порівнянні з G6.31 ДТ і G6.31 AAEE. Такий більш низький системний вплив може призвести до кращого профілю безпеки для G6.31 AARR в порівнянні з G6.31 ДТ і G6.31 AAEE.

15

Матеріали і способи

А. ІФА загального Fab

20

Планшети ІФА покривали AffinePure F(ab')₂ фрагментом козячого анти-людського IgG протягом ночі при 4 °С. Потім планшети промивали 3 рази перед інкубацією з блокуючим буфером (PBS pH 7,4, 0,5 % BSA і 15 м.д. PROCLIN™). Після 3 промивок, рідинні і склоподібні зразки, зібрані у кроликів NZW, яким ввели ДТ G6.31, G6.31 AARR або G6.31 AAEE, інкубували в планшетах протягом 2 годин при кімнатній температурі при обережному перемішуванні. Потім молекули G6.31, зв'язані з покриваючими антитілами, були потім виявлені з кон'югованим F(ab')₂ пероксидазою козячим анти-людським IgG протягом 1 години при кімнатній температурі. Після 3 промивок розчин субстрату ТМБЕ-1000 додавали до планшетів протягом 30 хв і реакцію зупиняли з використанням 1 М Н₃РО₄. Сигнал реєструвався при 450/620 нм.

25

Концентрації молекул G6.31 визначали з використанням стандартної кривої.

Приклад 12: VEGF-індуковані аналізи міграції HUVEC

Варіанти G6.31 були протестовані на здатність інгібувати міграцію HUVEC, індуковану VEGF. Аналізи міграції HUVEC варіантів, зазначених в таблиці 15, були виконані з використанням 24-багатоямкових систем вставки Falcon (BD Biosciences кат. 351184). Вставки попередньо покривали 8 мг/мл мишачого ламініну (LifeTechnologies 23017-015) протягом ночі. HUVEC голодували протягом ночі, збирали і ресуспендували в аналітичному середовищі (EBM-2, 0,1 % BSA). Клітини (5×10^4) додавали в верхню камеру і 20 нг/мл VEGF додавали в нижню камеру для стимуляції міграції в присутності або за відсутності різних рівнів дози блокуючих антитіл протягом 16 годин. Після фіксації і скребків з верхньої сторони мембрани, клітини на нижній поверхні фіксували метанолом і фарбували за допомогою SYTOX® зеленого (LifeTechnologies S7020). Зображення були отримані з використанням інвертованого флуоресцентного мікроскопа, а число клітин було проаналізовано з використанням програмного забезпечення ImageJ.

На Фіг.13 показаний графік інгібування міграції HUVEC, індукованої VEGF, за допомогою G6.31 LC-N94A в порівнянні з вихідним G6.31 при різних концентраціях Fab. Як можна бачити з Фіг.13, одиночна мутація LC-N94A була значно менш ефективною, за допомогою близько в п'ять разів, в аналізі HUVEC міграції, індукованої VEGF, в порівнянні з вихідним ДТ G6.31. Як показано в таблиці 15, подвійний мутант LC-N94A.LC-F83A також був близько в п'ять разів менш сильним в цьому аналізі в порівнянні з вихідним ДТ G6.31. Чотириразовий мутант LC-N94A.LC-F83A.HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE) відновлював і трохи поліпшував специфічну активність (Таблиця 15). Дивно, що чотириразовий мутант N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR) значно підвищував специфічну активність близько в два рази в порівнянні з вихідним ДТ G6.31 (таблиця 15).

Таблиця 15

Специфічна активність клітин варіантів G6.31,
визначених за допомогою IC50 в аналізі міграції HUVEC

Fab	IC50 відносно G6.31
G6.31	1
LC-N94A	5,2
LC-N94A.LC-F83A (AA)	5,1
LC-N94A.LC-F83A HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	0,9
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	0,5
ранібізумаб	0,9

Приклад 13: Кон'югація гіалуронової кислоти (HA) до G6.31 AARR і інших антитіл

Сучасні підходи до лікування окулярних порушень, пов'язаних з патологічним ангиогенезом (наприклад, AMD (наприклад, вологою AMD), DME, DR або RVO), зазвичай включають інтравітреальну ін'єкцію антагоністів VEGF (наприклад, анти-VEGF Fab ранізіумаб). Оскільки сайт дії анти-VEGF Fab знаходиться в задній частині ока в сітківці, а також тому, що Fab може мати відносно короткий час перебування в оці, максимальна користь для пацієнтів від анти-VEGF Fab зазвичай досягається за допомогою щодо частих доз (наприклад, Q4W) за допомогою інтравітреальної ін'єкції. Бажано, щоб тривалі дії анти-VEGF антитіл або фрагментів антитіл (наприклад, Fab) для окулярних порушень були бажаними, щонайменше частково, для зменшення частоти дозування, що призвело до поліпшення зручності і комплаєнса пацієнта. У цьому прикладі оцінювали вплив кон'югуючої лінійної, незшитої гіалуронової кислоти (HA) на G6.31 варіант G6.31 AARR. Проаналізовано молекулярні властивості кон'югатів, фармакокінетичні параметри (наприклад, життєвий цикл і кліренс), термодинамічна стабільність і інгібуюча активність VEGF.

Модельний кролячий Fab (rabFab; Shatz et al., Mol. Pharmaceutics 2016 року; ідентифікатор PubMed (PMID) 27244474) був використаний в рамках цього аналізу. Розробка технологій доставки для терапії білками зазвичай включає тестування на відповідних моделях тварин для демонстрації корисності in vivo. Кролячі моделі зазвичай використовуються під час попередніх досліджень окулярної фармакокінетики. На жаль, більшість людських і гуманізованих антитіл є імуногенними у кроликів, виключаючи оцінку ключових фармакокінетичних параметрів з використанням технологій доставки тривалої дії. Для вирішення цієї проблеми був розроблений

сурогатний склад, який представляє собою подібний з кролячим Fab ("rabFab"), який корисний для оцінки технологій доставки в кролячих моделях. rabFab, описаний в цьому документі, було отримано з моноклонального антитіла кролика, яке зв'язується з фосфо-з-Met людини. Способи отримання кролячих антитіл, включаючи моноклональні антитіла кролика, добре відомі в даній області. Див., наприклад, патенти США № 5675063 та/або 7429487. Ілюстративне моноклональне антитіло кролика, яке зв'язується з людським фосфо-с-Met, комерційно доступним від Abcam (Кембридж, Массачусетс, США), номер продукту ab68141.

У цих експериментах, молекули G6.31 AARR або rabFab Fab-C кон'юговані з лінійними незшитими HA різних середньомасових молярних мас (Мв), включаючи 40 кДа (HA40K-), 100 кДа (HA100K-), 200 кДа (HA200K-) і 600 кДа (HA600K-). Fab-C молекули являють собою Fab молекули, які експресуються таким чином, що послідовність усікається при першому шарнірі цистеїну, в результаті чого Fab з вільним цистеїном безпосередньо з експресії. Можуть також використовуватися молекули Fab', які являють собою Fab-молекули з вільним цистеїном, що утворюються при перетравленні повнорозмірного моноклонального антитіла. Для кон'югатів HA, описаних в цьому прикладі, молекули Fab-C ковалентно приєднані до груп карбонової кислоти на сахаридних одиницях глюкуронової кислоти HA. На першій стадії синтезу певний відсоток цих кислотних груп на HA перетворювали в малеїміди (зазвичай 2-10 % кислотних груп перетворювали). Потім молекули Fab-C кон'юговані з малеїмідними групами через вільний цистеїн на молекулі Fab-C. Однак невеликі модифікації хімії кон'югації можуть бути використані для кон'югації молекул Fab або інших форматів антитіл з HA.

Комбінація гель-проникаючої хроматографії (SEC), багатокутного світлорозсіювання показника заломлення (RI) (MALS) і квазіпружного розсіювання світла (QELS) (також званого SEC-RI-MALS-QELS) використовувалася для оцінки HA Мв, кон'югату Мв, процентного завантаження Fab (визначається як відсоток груп карбонових кислот HA, які зайняті ковалентно приєднаною Fab-молекулою), гідродинамічний радіус (Rh), вільний Fab (визначений як відсоток молекул Fab, які є вільними в розчині, а не ковалентно приєднані до молекули HA) і фракції маси білка (маса білка/(маса білка + маса HA) обраних кон'югатів HA-Fab (таблиця 16). На Фіг.14 показані ілюстративні результати SEC-RI-MALS-QELS для оцінки середньомасової молярної маси (Мв) HA40K-rabFab, HA200K-rabFab і HA600K-rabFab (зверніть увагу, що дані QELS не показані на фіг. 14).

Таблиця 16

Властивості обраних кон'югатів HA-Fab, оцінених за допомогою SEC-RI-MALS-QELS

Зразок	HA Мв (кДа)	Кон'югат Mw (кДа)	% Завантаження Fab	Rh (нм)	Вільний Fab	Масова частка білка
HA40K-rabFab	45,3	636,2	7,4	~ 10*	0,45 %	0,929
HA100K-rabFab**	110,0	679,3	5,9	17,3	3,71 %	0,838
HA200K-rabFab	204,3	1805,3	8,6	~ 30*	0,55 %	0,887
HA600K-rabFab	619,8	2569,2	3,2	~ 50*	1,87 %	0,759
HA200K-G6.31 AARR	204,3	2478,0	11,0	27,7	0,63 %	0,918

* Приблизні значення Rh

** Зразок, досліджений в дослідженні ФК кролика (див., наприклад, фіг. 16 і нижче)

Для лікування окулярних порушень, таких як AMD, може знадобитися тривалий період напіввиведення з очей, але короткий системний період напіввиведення, наприклад, для мінімізації системного впливу проти VEGF. Кліренс HA від системної циркуляції опосередковується гіалуронідазою, несучої печінкові клітини. Попередні повідомлення

показують, що активність гіалуронідази на нативній HA включає в себе впізнавання через групи карбонової кислоти глюкуронової кислоти. Оскільки ці карбоксильні групи були модифіковані для приєднання до молекул Fab-C, була оцінена здатність кон'югованого HA до ферментативного переварювання гіалуронідазами. HA-кон'югований rabFab зберіг ферментативну сприйнятливість до перетравлювання гіалуронідазами-2 (HYAL2), як оцінюється аналізом SEC-MALS з HYAL2-інкубацією HA і HA100K-rabFab (Фіг.15).

Визначали вплив HA-кон'югації Fab-фрагментів на очулярні фармакокінетичні параметри (наприклад, період напіввиведення і кліренсу) в склоподібне тіло кролика після інтравітреального введення. Кон'югація rabFab з HA100K (HA100K-I¹²⁵-rabFab) приводила до значного зменшення кліренсу і значного збільшення вітреального періоду напіввиведення в порівнянні з некон'югованим rabFab або ранібізумабом (фіг.16 і таблиця 17). HA100K-кон'югований rabFab мав приблизно чотириразове збільшення періоду вітреального напіввиведення ($t_{1/2}$) в порівнянні з некон'югованим rabFab за історичними даними (11,9 дня проти 3,2 дня відповідно) (фіг.16 і таблиця 17). В Таблиці 17 також показані Rh для rabFab і HA100K-I¹²⁵-rabFab. Ці дані вказують на те, що кон'югація HA збільшувала гідродинамічний радіус Fab і приводила до уповільнення вітреального кліренсу і збільшення періоду вітреального напіввиведення.

Таблиця 17

Кліренс rabFab і HA100K-I¹²⁵-rabFab з кролячого склоподібного тіла після інтравітреального введення

Опитний зразок	Rh (нм)	$t_{1/2}$ (днів)	CL (мл/день)
HA100K-I ¹²⁵ -rabFab	17,3	11,9	0,076
rabFab (історичний)	2,5	3,2	0,32

Лінійна кореляція між гідродинамічним розміром (наприклад, з точки зору гідродинамічного радіуса) і вітреальним часом життя (наприклад, з точки зору напіввиведення), а також історичні дані для rabFab, rabFab, кон'югованого з поліетиленгліколем 20 кДа (ПЕГ) (rabFab-20 кДа ПЕГ), і rabFab, кон'югований з ПЕГ 40 кДа (rabFab-40 кДа ПЕГ) (Shatz et al., вище), в поєднанні з даними, описаними вище для HA100K-rabFab, дозволив передбачити вітреальний період напіввиведення G6.31, кон'югованого з HA100K або HA200K і G6.31, кон'югованого з HA300K (фіг.17). HA100K-G6.31 має передбачений вітреальний період напіввиведення приблизно 11 днів, в той час як HA200K-G6.31 має ще більший передбачений вітреальний період напіввиведення приблизно 17 днів (фіг.17). HA300K-G6.31 має передбачений вітреальний період напіввиведення приблизно 19 днів (фіг.17). Ці результати дають ще один доказ того, що кон'югація G6.31 AARR або інших варіантів G6.31, описаних в цих документах, з лінійним незшитим HA призводить до збільшення очулярного часу перебування (наприклад, періоду напіввиведення) і зменшення кліренсу після інтравітреальної ін'єкції.

Був також оцінений ефект кон'югації HA на термодинамічну стабільність Fab (таблиця 18). Ковалентне приєднання rabFab до HA трьох різних молярних мас змінювало термодинамічну стабільність Fab, що підтверджується аналогічним початком T_m і піком T_m для кон'югатів в порівнянні з вихідною Fab (таблиця 18).

Таблиця 18

Кон'югація Fab до HA істотно не змінює термодинамічну стабільність Fab

Зразок	T_m Початок, °C	T_m , °C
rabFab	66,8	85,6
HA39K-rabFab	69,5	84,1
HA100K-rabFab	69,8	84,0
HA300K-rabFab	69,7	83,8

Нарешті, оцінювали вплив кон'югації HA на специфічну активність інгібування VEGF G6.31 AARR. Несподівано було виявлено, що кон'югація AARR G6.31 з лінійним незшитим HA

призводила до значного підвищення активності в порівнянні з вихідним Fab при порівнянні в рKDR-аналізі для інгібування VEGF (таблиця 19). Значення qAC50 в таблиці 19 вказують концентрацію, необхідну для отримання 50 % відгуку в форматі аналізу активності. Значення qAC50 еквівалентні значенням IC50. HA-кон'югований G6.31 AARR мав приблизно 7-кратне збільшення здатності в порівнянні з некон'югованим батьківським Fab (таблиця 19). Отже, кон'югація G6.31 AARR і інших варіантів G6.31, описаних в цьому документі, може бути корисна як для поліпшення вітреальних фармакокінетичних параметрів (включаючи період напіввиведення і кліренсу), так і інгібуючу здатність VEGF.

Таблиця 19

Кон'югація G6.31 AARR до HA призводить до поліпшеної інгібуючої здатності VEGF

Опитний зразок	qAC50, нМ
G6.31.AARR	0,9325
HA100K-G6.31 AARR	0,1346

Виходячи з вищенаведених експериментальних даних, HA-кон'юговані молекули AARR G6.31 мають значно поліпшені характеристики для лікування окулярних порушень, в тому числі AMD (наприклад, волога AMD), DME, DR і RVO. Ці поліпшені характеристики включають підвищену здатність і можливість для менш частого дозування через збільшення часу вітреального перебування.

Матеріали і способи

А. Синтез функціоналізованої малеїмідом HA (HA-mal)

Лінійні, незшиті HA-полімери з різними молярними масами отримували з Lifecore Biomedical. HA модифікували малеїнімідними групами з використанням водної реакції з реагентом зв'язування 4-(4,6-диметокси-1,3,5-тріазин-2-іл) -4-метилморфолінія хлориду (DMTMM) і лінкером N-(2-аміноетил) малеїміду солі трифторацетата (AEM). HA розчиняли в 100 мМ 2-(N-морфоліно)етансульфонової кислоті з pH 5,5 при 2,5 мг/мл і до цього розчину додавали 1,5 молярного надлишку DMTMM і 3,75 молярного надлишку AEM (атомні надлишки розраховували на основі молей карбонової кислоти в HA) при перемішуванні. Розчин нагрівали до 70 °C протягом 2 годин.

Надлишок AEM і DMTMM видаляли з реакції через процедуру знесолення. Насосна колона HiPrep™ 26/10 була змонтована на системі очищення ÄKTA™ і врівноважена з 10 мМ ацетату натрію, pH 4,0 150 мМ NaCl. Реакцію вводили акуратно в колонку і пік HA-mal збирали відповідно до абсорбцією при 302 нм і концентрували до більш ніж 5 мг/мл з використанням відцентрових ультрафільтраційних пристроїв. Малеїмідну концентрацію в вихідному розчині HA-mal вимірювали поглинанням при 302 нм з використанням ультрафіолетового видимого спектрофотометра, а молярне відношення малеїмідних груп на ланцюг HA оцінювали за допомогою гел'фільтраційної хроматографії за розміром з багатокутним світлорозсіюванням (SEC-MALS).

В. Кон'югація Fab-C з HA-mal

Розчин Fab-C доводили до 6,5 за допомогою 1М фосфату pH 6,5 до кінцевої концентрації фосфату 50 мМ. Етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТК) висушували в розчині до кінцевої концентрації 2,5 мМ. Розчин Fab-C перемішували і до нього додавали HA-mal, розведений в реакційний буфер (10 мМ фосфату 150 мМ NaCl 2,5 мМ ЕДТК (pH 6,5)). Стехіометрію встановлювали на 1,2 моль Fab-C на моль малеїміду в кінцевій реакції, і обсяг встановлювали для отримання кінцевої концентрації білка 1 мг/мл. Реакцію кон'югування проводили при кімнатній температурі при перемішуванні. Через 3 години меркаптоетанол додавали при 2 молях на моль малеїміду для покриття непрореагувавших малеїмідних груп. Через 30 хвилин після додавання меркаптоетанола реакційну суміш розбавляли до менш ніж 50 мМ NaCl з 10 мМ фосфатом (pH 6,5) для очищення.

Очищення проводили з використанням аніонообмінної хроматографії для відділення вільного димеру Fab-C і Fab від кон'югату. Колонку HiTrap™ Q FF 5 мл встановлювали на системі очищення ÄKTA™ і врівноважували з 10 мМ HisHCl (pH 5,5). Розбавлену реакцію пропускали через колонку, захоплюючи кон'югат HA-Fab і одночасно здійснюючи елюцію вільного Fab-C і димеру. Після промивання з 10 мМ HisHCl (pH 5,5) 100 мМ NaCl кон'югат елювали ступінчастим градієнтом до 10 мМ HisHCl (pH 5,5) 500 мМ NaCl. Елюований кон'югат об'єднували і розбавляли з 10 мМ HisHCl (pH 5,5) до кінцевої композиції 10 мМ HisHCl (pH 5,5) 150 мМ NaCl. Кон'югат складу концентрували відцентровою ультрафільтрацією.

C. Аналіз кон'югатів HA-Fab

Залишковий вільний Fab-вміст, загальна молярна маса кон'югату і масова частка білка оцінювалися комбінацією гель-фільтраційної хроматографії (SEC) з багатокутним світлорозсіюванням показника заломлення (RI) (MALS) і квазіпружного розсіювання світла (QELS) (також званий SEC-RI-MALS-QELS) на вискоефективній рідинній хроматографії Agilent 1200 (BEPX) з детектором WIA T Optilab T-rEX RI і детектором WALET HELEOS-II MALS in-line. Колонка Tosoh G6000 PWxl використовувалася для аналізу з PBS (pH 7,4) в якості робочого буфера. Контроль BSA використовувався для нормалізації детектора MALS і виправлення для розширення зон між детекторами. Зміст вільного Fab вимірювали шляхом інтеграції піків УФ-A₂₈₀, відповідних кон'югату Fab і HA-Fab. Молекулярну масу кон'югату брали у вигляді середньомасової молекулярної маси (Мм) (також званої середньомасовою молярною масою) кон'югативного піку. Масова частка білка розраховувалася з використанням аналізу білкового кон'югату з використанням диференціальних RI (dRI) і UV A₂₈₀ сигналів.

D. Динамічна скануюча калориметрія (DSC) Дослідження кон'югатів HA-rabFab

Розчини rabFab, rabFab, кон'югованих з HA, мають середньозважену молярну масу (Мв) 39 кДа (HA39K-rabFab), rabFab, кон'югованих з HA, мають Мв 100 кДа (HA100K-rabFab) і rabFab, кон'югованих з HA, мають Мв 300 кДа (HA300K-rabFab) отримували при концентрації 0,5 мг/мл (концентрація приведена на білковій основі) в 10 mM HisHCl (pH 5,5) 150 mM NaCl. Дослідження DSC проводилися на мікрокалориметрі VP-DSC (MicroCal, Inc.) від 15 до 105 °C зі швидкістю 1 °C/хв. Початкове сканування тільки одного буфера віднімалося з кожного вибіркового сканування. Температуру плавлення (T_m) і початок T_m оцінювали з використанням доданого програмного пакету ORIGIN.

E. Аналізи активації фосфорильованого KDR (pKDR) рецептора

Клітини CHO, сконструйовані для надекспресії KDR (клітини KDR-CHO, див. Binétruy-Tournaire et al., EMBO J. 19 (7): 1525-1533, 2000 і Benzinger і ін. BBA Biomembranes 1466: 71-78, 2000., які включені в цей документ шляхом посилання в усій їхній повноті) висівали на 1×10⁴ клітин/ямка в 80 мкл середовища для висаджування клітин (50:50 DMEM з високим вмістом глюкози/F-12 Хема, 0,2 % BSA, 0,25 % діалізованого фетальної бичачої сироватки (FBS), 25 mM HEPES і 2 mM L-глутамакса) в 96-ямковому планшеті з плоским дном для культивування тканини. Клітини інкубували протягом ночі при 37 °C. Паралельно на 384-ямковому планшеті ІФА NUNC® MAXISORB® (Thermo кат. № 439454) було покрито 25 мкл анти-gD антитіла (Genentech), розведеного в PBS, і інкубували при 4 °C протягом ночі.

На наступний день, за 2 години до стимуляції клітин, планшети для культивування тканин струшували і ущільнювали, а культуральне середовище замінювали на 40 мкл вільного від сироватки середовища для стимуляції клітин (50:50 DMEM з високим вмістом глюкози/F-12 Хема, 0,5 % BSA і 25 mM HEPES) і інкубували протягом 2 годин при 37 °C. Три-кратні серійні розведення G6.31 AARR або HA100K-G6.31 AARR були зроблені в середовищі стимуляції клітин. Розчини людського VEGF₁₆₅ (100 нг/мл) також отримували в середовищі стимуляції клітин. Використовуючи чашку з глибокої ямкою, зразки з серійних розведень G6.31 AARR або HA100K-G6.31 AARR змішували з розведеними зразками VEGF і інкубували протягом 1 години при 37 °C. 40 мкл отриманих сумішей додавали в кожен ямок клітин для загального об'єму культивування 80 мкл. Ямки, що мають тільки VEGF або без вмісту VEGF, також отримували в якості контролів. Клітини інкубували протягом 15 хв при 37 °C. Культуральне середовище струшували і ущільнювали, а також додавали 25 мкл охолодженого до льоду буфера для лізису клітин (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0,5 % TRITON™ X-100, 1x HALT® протеази і коктейлю інгібітора фосфатази (Thermo кат. № 78444, додавали безпосередньо перед використанням з 100-х вихідного розчину), 5 mM EDTK). Клітини лізували на льоду протягом 15 хв, перш ніж приступати до ІФА.

Ямки планшетів ІФА, вкриті анти-gD, промивали 3 рази промивочним буфером (PBS з 0,05 % TWEEEN® 20, pH 7,4). Ямки блокували з 80 мкл блокуючого буфера (PBS з 0,5 % BSA (R&D Systems, кат. № # DY995)) протягом 1 години при кімнатній температурі. Потім ямки промивали три рази буфером промивання. Потім до кожної ямки додавали 25 мкл клітинного лизата на ямку і інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі з наступним промиванням ямок чотири рази буфером промивання. 25 мкл розведеного 1:2000 антифосфотирозина (Clone 4G10) біотин-кон'югованого антитіла (0,5 мкг/мл) (Millipore кат. № 16-103) додавали в аналітичному буфері (PBS з 0,5 % BSA, такий же, як блокуючий буфер) в кожен ямок і отримані суміші інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі, потім три рази промивали буфером промивання. 25 мкл 1:10000 розведеної пероксидази хрому (HRP)-Streptavidin (GE Healthcare UK, кат. № RPN44OIV) додавали в аналітичному буфері в кожен ямок і інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, а потім три додаткових промивання буфером

промивання. Потім в кожну ямку додавали 25 мкл TMB, і колір залишали для розвитку протягом 20 хв до додавання 25 H₂SO₄ для припинення реакції. Нарешті, оптичну щільність ямок зчитували на планшетному рідері при 450/620 нм.

Ф. Перетравлення гіалуронідазами HA100K-rabFab

- 5 Щоб підтвердити, що Fab-кон'югація до 10 % (у відсотках, виражена на основі доступних кислотних груп на HA), не змінювала чутливість гіалуронідази кон'югатів HA-Fab, HA з Mw 100 кДа (HA100K) і rabFab, кон'югованих з HA100K (HA100K-rabFab) інкубували при 200 мкг/мл HA (концентрація HA100K-rabFab була доведена до досягнення концентрації 200 мкг/мл по відношенню до HA-остову) за допомогою 4 мкг/мл гіалуронідази-2 в 10 мМ ацетат натрію, pH 4,5. Зразки інкубували при 37 °C і відразу ж вводили в SEC-RI-MALS з 30-хвилинними інтервалами для аналізу Mw, як описано вище.

Г. Дослідження ФК для оцінки швидкості кліренсу HA-Fab з склоподібного тіла кролика

Окулярний фармакокінетичний профіль HA100K-rabFab в склоподібному тілі кролика порівнювали з історичними даними для rabFab, як описано нижче.

- 15 HA100K-rabFab мітили з ¹²⁵I за день до дозування. Для приготування складів доз, відповідну кількість HA100K-rabFab обмінювали з трис-йодуючим буфером (25 мМ Трис HCl, 0,4 М NaCl, pH 7,5) з використанням центрифужних фільтрувальних пробірок Millipore AMICON® 30K. Пробірку Пірса попередньо покриту йодом, змочували Трис-йодуючим буфером і декантували. Відповідний обсяг Трис-йодуючого буфера додавали до нижньої частини пробірки з подальшою відповідною кількістю Na¹²⁵I (Perkin Elmer). Йоду давали активуватися протягом 15 хв зі збовтуванням кожні 30 секунд. Відповідний об'єм випробуваного зразка, Трис-йодуючого буфера і активованого йоду додавали в мікроцентрифужну пробірку NUNC® і перемішували обережним струшуванням протягом приблизно 1-5 хв. Реакцію йодування припиняли додаванням очищуючого буфера (тирозин, 2мг/мл Трис-буфера), і склад змішували і інкубували протягом 5 хв з вібруючим перемішуванням протягом 1 і 4 хв. Для очищення білка, пробірку фільтруючої центрифуги AMICON® 30K отримували центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 15 хв з PBS. Вміст пробірки NUNC® додавали в пробірку фільтруючої центрифуги AMICON® 30K і промивали до чотирьох разів в PBS для отримання приблизно 400 мкл остаточного обсягу радіоактивно-міченого випробуваного зразка. Визначали радіоактивність, концентрацію білка і радіохімічну чистоту кожного випробуваного зразка. За допомогою піпетки, вміст пробірки AMICON® переносили в пробірку NUNC®, і склад доводили до кінцевої концентрації приблизно 10 мг/мл.

- 35 HA100K-rabFab-¹²⁵I вводили інтравітреально (500 мкг/око) в очі новозеландських білих кроликів (n=24 ока). Для інтравітреальних ін'єкцій кроликів седували/знеболювали для впливу ізофлураном і поміщали в лежаче положення на боці. Для обох очей застосовували офтальмологічний розчин тропікаміду (дві краплі) і 2,5 % фенілефрин HCl (одна крапля). Місцевий пропаракаїн застосовувався до кожного ока безпосередньо перед приготуванням і дозуванням. Кон'юнктивальні склепіння були промиті розведеним 1:50 розчином бетадина, а краї повік були протерті нерозбавленим 5 % розчином бетадина. Суперотемпоральну бульбарну кон'юнктиву просочували нерозведеним розчином бетадина. Штангенциркуль Джеймсон використовувався для позначки плями від 1,5 до 2,0 мм ззаду до лімбу на суперотемпоральній бульбарній кон'юнктиві. Кон'юнктивальні щипці використовувалися для фіксації положення очного яблука лівою рукою, в той час як голка, прикріплена до ін'єкційного шприца, вставлялася правою рукою в зазначену пляму через склеру і просувалася на 5 мм в склоподібне тіло. Ін'єкційна голка була розташована так, що вона звернена до задньої осі очного яблука, і вміст було доставлено в середину склоподібного тіла, повільно опускаючи поршень шприца. Голку, прикріплену до ін'єкційного шприца, дезінтегрували, а епісклеральні тканини наближалися до місця введення, захопленого кон'юнктивальними щипцями протягом 30 секунд, щоб зменшити рефлюкс вводимого матеріалу. Місце введення дози було протерто для залишкової радіоактивності. Приготування і введення дози повторювали таким же чином для другого ока. Відповідний тестовий зразок витримували на мокрому льоду протягом всього часу процедури і вводили один раз при обсязі дози 50 мкл на око. Непрямі офтальмоскопічні дослідження проводилися після ін'єкції, щоб уникнути контакту лінзи або сітківки. Збирають дозу кожного місця ін'єкції і зберігали при кімнатній температурі до аналізу за допомогою рідинного сцинтиляційного лічильника (LSC) для визначення залишкової радіоактивності. Відновлену радіоактивність віднімали з введеної кількості, щоб отримати фактичну введену радіоактивну дозу.

- 60 Зразки крові збирали з яремної вени тварин в пробірки, які не містять антикоагулянтів при попередній дозі кімнатної температури, через 6 годин після введення дози і 1, 2, 4, 7, 11, 14, 21 і 28 днів після введення дози. Аліквоту (приблизно 0,1 мл) цільної крові збирали і обробляли для

радіоаналіза. Кров, що залишилася центрифугували при кімнатній температурі для отримання сироватки і обробляли для радіоаналіза.

Дві тварини в момент часу піддавали евтаназії шляхом внутрішньовенної ін'єкції розчину евтаназії з подальшою аускультасією. Термінальні моменти часу: 6 годин після прийому і 2, 7, 14, 21 і 28 днів після прийому. Внутрішньоочна рідина, лінза, склоподібне тіло, сітківка/судинна оболонка і склера були зібрані у призначених тварин. Очі були видалені, і будь-яка стороння тканина була обрізана зовні очного яблука. Внутрішньоочну рідину видаляли шприцом з голкою туберкуліну і збирали в попередньо зважену гамма-пробірку. Око, що залишилося заморожували в рідкому азоті протягом приблизно 30 секунд. На охолодженій ріжучій поверхні були видалені рогівка, райдужна оболонка і лінза. Лінзу промивали невеликою кількістю PBS і промивку збирали в гама-пробірку. Лінзу промакували насухо і поміщали в попередньо зважену гама-пробірку. Око повторно заморожували в рідкому азоті в міру необхідності. Склера була відрізана і очищена від склоподібного тіла. Склоподібне тіло видаляли і поміщали в попередньо зважений контейнер для солюбілізації. Склеру з прикріпленою сітківкою/судинної оболонкою занурювали в 1 мл PBS для промивання, який об'єднували з попереднім промиванням, і тканину обережно промакували насухо. Сітківка/судинна оболонка віддалялася зі склери і переносилася в окремі попередньо зважені гама-пробірки. Відповідні поверхні і інструменти були протерті вологою марлею і зібрані в гама-пробірку для підрахунку. Всі тканини, промивання і серветки були зібрані в пластиковий контейнер і оброблені для радіоаналіза.

Одне око в момент часу від обраних тварин (включаючи тварин з тимчасових точок 2, 14 і 28 днів після прийому) обробляли для радіохроматографічного профілювання склоподібного тіла. Праве око було видалено, а стороння тканина була обрізана зовні очного яблука. Внутрішньоочну рідину видаляли шприцом з голкою туберкуліну і поміщали в попередньо зважену гамма-пробірку. Максимальна кількість склоподібного тіла була зібрана з використанням 10-мл шприца з голкою 18 калібру. Вміст переносили в попередньо зважений контейнер для аналізу за допомогою BEX-Gamma-RAM™. Зразки склоподібного тіла зберігалися в холодильнику або на мокрому льоду для радіохроматографічного профілювання. Частина, що залишилася, тканини правого ока поміщали в попередньо зважений контейнер для солюбілізації і обробляли для радіоаналіза.

Одиночні або дубльовані аліквоти складів доз, сироватки і цільної крові добре змішували і відбирали для прямого аналізу радіоактивності через гама-лічильник. Окулярні тканини підраховували безпосередньо, розводили в PBS або солюбілізували в інкубаційній печі, встановленої при приблизно 50 °C в розчині 3N KOH/метанол/TRITON™ X-100, і відбирали три рази для аналізу радіоактивності через лічильник гама-випромінювання. Всі зібрані радіоактивні зразки підраховувалися протягом як мінімум 5 хвилин або 100 000 відліків в двох примірниках або в трьох примірниках, з урахуванням розміру вибірки. Всі результати вибірки (розраховані за зразком розпадів за хвилину/g), які мали радіоактивність більше 200 розпадів за хвилину, перебували в межах 15 % від середнього значення.

Радіохроматографічне профілювання проводили на зразках склоподібного тіла з правого ока у однієї тварини через 2, 14 і 28 годин після введення дози. Зразки аналізували відповідно до придатних для використання методом BEX-Gamma-RAM™. Пікові площі і час утримування порівнювали з оцінкою цілісності дослідного зразка з плином часу. Для приготування зразків гомогенізатор PRECELLYS® 24 попередньо охолоджений від -10 до 0 °C з охолодженням потоком азоту. Гранули діоксиду цирконію додавали в відповідну пробірку. При використанні піпетки з позитивним розміщенням в пробірку, що містить гранули діоксиду цирконію, додавали зразок склоподібного тіла. Зразки поміщали в заздалегідь охолоджений гомогенізатор PRECELLYS® 24 і гомогенізували при 6500 об/хв протягом шести 60-секундних циклів. Пробірки центрифугували протягом 10 хв при 14000 об/хв перед аналізом.

Фармакокінетичні параметри оцінювали з використанням PHOENIX® WinNonlin® версії 6.2.1 (Certara USA, Inc., Принстон, Нью-Джерсі). Для оцінки параметрів використовувався неселективний підхід, який узгоджується з інтравітреальним способом введення. Період напіврозпаду для HA100K-rabFab-¹²⁵I в склоподібному тілі кролика становив 11,9 дня, в порівнянні з 3,2 дня для rabFab за історичними даними (Shatz et al., Mol. Pharmaceutics 2016; PubMed identifier (PMID) 27244474).

Хоча вищенаведений винахід було описано більш детально за допомогою ілюстрації та приклади для ясності розуміння, описи і приклади не слід розглядати як обмежуючі обсяг винаходу. Розкриття всієї патентної та наукової літератури, наведені в цьому документі, повністю включені в якості посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

5
 <110> Genentech, Inc. et al.
 <120> ОПТИМІЗОВАНИ ВАРІАНТИ АНТИ-VEGF АНТИТІЛ

10
 <130> 50474-110WO3
 <150> США 62/271913
 <151> 2015-12-28

15
 <150> США 62/222698
 <151> 2015-09-23
 <160> 69

20
 <170> PatentIn версія 3.5
 <210> 1
 <211> 5

25
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична конструкція

30
 <400> 1
 Asp Tyr Trp Ile His
 1 5

35
 <210> 2
 <211> 17
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична конструкція

40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа являє собою Ile або His

45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа являє собою Ala або Arg

50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)

55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)

```

    <223> Хаа являє собою Tyr або Lys

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
5    <222> (9)..(9)
    <223> Хаа являє собою Thr або Glu

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
10   <222> (10)..(10)
    <223> Хаа являє собою Arg, Tyr, Gln, або Glu

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
15   <222> (12)..(12)
    <223> Хаа являє собою Ala або Glu

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
20   <222> (16)..(16)
    <223> Хаа являє собою Lys або Glu

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
25   <222> (17)..(17)
    <223> Хаа являє собою Gly або Glu

    <400> 2

30   Gly Xaa Thr Pro Xaa Gly Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Asp Ser Val Xaa
     1              5              10              15

    Xaa
35

    <210> 3
    <211> 11
40   <212> БІЛОК
    <213> Штучна послідовність

    <220>
    <223> Синтетична конструкція
45

    <400> 3

    Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr
    1              5              10
50

    <210> 4
    <211> 11
    <212> БІЛОК
55   <213> Штучна послідовність

    <220>
    <223> Синтетична конструкція

```

```

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
5    <222> (5)..(5)
    <223> Хаа являє собою Asp або Arg

    <400> 4

10   Arg Ala Ser Gln Xaa Val Ser Thr Ala Val Ala
    1              5              10

    <210> 5
15   <211> 7
    <212> БІЛОК
    <213> Штучна послідовність

    <220>
20   <223> Синтетична конструкція

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
25   <222> (1)..(1)
    <223> Хаа являє собою Ser або Met

    <400> 5

30   Xaa Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
    1              5

    <210> 6
35   <211> 9
    <212> БІЛОК
    <213> Штучна послідовність

    <220>
40   <223> Синтетична конструкція

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
45   <222> (1)..(1)
    <223> Хаа являє собою Gln, Asn, або Thr

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
50   <222> (6)..(6)
    <223> Хаа являє собою Ala, Asn, Gln, або Arg

    <400> 6

55   Xaa Gln Gly Tyr Gly Xaa Pro Phe Thr
    1              5

```

<210> 7
 <211> 17
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 7
 10
 Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 15 Gly
 <210> 8
 20 <211> 11
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> Синтетична конструкція
 <400> 8
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 30 1 5 10
 <210> 9
 <211> 7
 35 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 40 <400> 9
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5
 45 <210> 10
 <211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 50 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 10
 55 Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe Thr
 1 5

<210> 11
 <211> 120
 <212> БІЛОК
 5 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична конструкція

 10 <400> 11

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

 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30

 20 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

 Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35
 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

 <220>
 50 <223> Синтетична конструкція

 <400> 12

 55 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

UA 125432 C2

	20	25	30
5	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys	Pro Gly Lys Ala Pro Lys	Leu Leu Ile
	35	40	45
10	Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
15	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65	70	75
20	Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe		
	85	90	95
25	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105	
30	<210> 13		
	<211> 30		
	<212> БІЛОК		
	<213> Штучна послідовність		
35	<220>		
	<223> Синтетична конструкція		
	<400> 13		
40	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10
45	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser		
	20	25	30
50	<210> 14		
	<211> 14		
	<212> БІЛОК		
	<213> Штучна послідовність		
55	<220>		
	<223> Синтетична конструкція		
	<400> 14		
60	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala		
	1	5	10
65	<210> 15		
	<211> 32		
	<212> БІЛОК		
	<213> Штучна послідовність		

<220>
 <223> Синтетична конструкція
 5 <400> 15
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 10 Met Arg Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 15 <210> 16
 <211> 11
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 20 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 16
 25 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 30 <210> 17
 <211> 23
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 35 <400> 17
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 40 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20
 45 <210> 18
 <211> 15
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 50 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 18
 55 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 32
 <212> БІЛОК
 5 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 10 <400> 19

 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 15 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

 20 <210> 20
 <211> 10
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Синтетична конструкція

 <400> 20
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 30 1 5 10

 <210> 21
 <211> 17
 35 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 40 <400> 21

 Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 45 Gly

 50 <210> 22
 <211> 17
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 55 <220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 22

Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

10

<210> 23
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

15

<220>
<223> Синтетична конструкція

<400> 23

20

Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe Thr
1 5

25

<210> 24
<211> 32
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

30

<220>
<223> Синтетична конструкція

<400> 24

35

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

40

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

45

<210> 25
<211> 23
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична конструкція

50

<400> 25

55

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys
20

5 <210> 26
 <211> 23
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 10 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 26

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 15

 Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys
 20
 20
 <210> 27
 <211> 15
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 25
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 27
 30
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 35 <210> 28
 <211> 32
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 40 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 28
 45 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 50 Leu Thr Ile Glu Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 55 <210> 29
 <211> 30
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 29

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

10 Ser Leu Glu Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser
20 25 30

<210> 30

<211> 14

15 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

20 <400> 30

Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

25

<210> 31

<211> 32

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

30

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 31

35

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

40 Met Asn Glu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 32

45

<211> 11

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

50 <223> Синтетична конструкція

<400> 32

55 Trp Gly Gln Gly Glu Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 33

<211> 120
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 33
 10 Glu Glu Gln Leu Val Glu Glu Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Glu Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 15 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 20 Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 25 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 30 Leu Gln Met Asn Glu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Glu Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 40 <210> 34
 <211> 107
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 34
 50 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 55 Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

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

5 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

10 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

15 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

20 <210> 35
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

25 <220>
<223> Синтетична конструкція

30 <400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

35 Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

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

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

50 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
85 90 95

55 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36
 <211> 107
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> Синтетична конструкція

 <400> 36

 10 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 15 Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

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

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

 25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

 <210> 37
 <211> 107
 40 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 45
 <400> 37

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 50

 Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

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

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

5 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

10 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
 85 90 95

15 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 38
 <211> 107
 <212> БІЛОК
 20 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

25 <400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

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

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

45 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe
 85 90 95

50 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

55 <210> 39
 <211> 14
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

5 <400> 39

Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

10

<210> 40

<211> 120

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

15

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 40

20

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

25

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

35

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

40

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

45

Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

50

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

55

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 41

5 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

10 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
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 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 42
<211> 120
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

40 <220>
<223> Синтетична конструкція

<400> 42

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

50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

55 Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

UA 125432 C2

	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
5	Ala	Arg	Phe	Val	Phe	Phe	Leu	Pro	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
10	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120									
	<210>	43														
	<211>	227														
15	<212>	БІЛОК														
	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	Синтетична конструкція														
20	<400>	43														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
25	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Ile	Ser	Asp	Tyr
				20					25					30		
30	Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
35	Ala	Gly	Ile	Thr	Pro	Ala	Gly	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50					55					60				
40	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
45				85						90					95	
	Ala	Arg	Phe	Val	Phe	Phe	Leu	Pro	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
50	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115				120						125			
55	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
		130					135					140				

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

5 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

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

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

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

20 Lys Thr His
 225

25 <210> 44
 <211> 32
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

30 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 44

35 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

40 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

45 <210> 45
 <211> 23
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична конструкція

50 <400> 45

55 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Asp Cys
 20

<210> 46
 <211> 107
 5 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 10
 <400> 46

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 15
 Asp Arg Val Thr Ile Asp Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 20
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 25
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 30
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 35
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
 85 90 95
 35 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

 <210> 47
 40 <211> 232
 <212> БІЛОК
 <213> Homo sapiens

 <400> 47
 45
 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 50
 Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30
 55
 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

UA 125432 C2

	50		55		60
5	Tyr 65	Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu	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	Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr	130	135	140	145
30	Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp	150	155	160	165
35	Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys	170	175	180	185
40	His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn	190	195	200	205
45	Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr	210	215	220	225
50	Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg	225	230		
55	<210> 48				
	<211> 228				
	<212> БІЛОК				
	<213> Штучна послідовність				
	<220>				
	<223> Синтетична конструкція				
	<400> 48				
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1	5	10	15

	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Ile	Ser	Asp	Tyr	
				20					25					30			
5																	
	Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
10																	
	Ala	Gly	Ile	Thr	Pro	Ala	Gly	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
15																	
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
20																	
	Leu	Gln	Met	Arg	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
25																	
	Ala	Arg	Phe	Val	Phe	Phe	Leu	Pro	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
30																	
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115					120					125				
35																	
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
		130					135					140					
40																	
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
45																	
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165					170					175		
50																	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
55																	
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
60																	
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
65																	
	Lys	Thr	His	Thr													
	225																

<210> 49
 <211> 228
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 49
 10
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 20 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 30 Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 45 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 50 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 55 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

UA 125432 C2

	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195					200					205			
5	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		210					215					220				
10	Lys	Thr	His	Leu												
	225															
	<210>	50														
	<211>	214														
15	<212>	БІЛОК														
	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	Синтетична конструкція														
20	<400>	50														
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
25	1				5					10					15	
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala
			20						25					30		
30	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35						40					45			
35	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50					55					60				
40	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75					80
45	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Tyr	Gly	Ala	Pro	Phe
					85					90					95	
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
				100					105					110		
50	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
			115					120					125			
55	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
		130					135					140				

UA 125432 C2

	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
	145	150 155 160
5	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
		165 170 175
10	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
		180 185 190
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
		195 200 205
15	Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
		210
20	<210> 51	
	<211> 120	
	<212> БІЛОК	
	<213> Штучна послідовність	
25	<220>	
	<223> Синтетична конструкція	
	<400> 51	
30	Glu Glu Gln Leu Val Glu Glu Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu	
	1	5 10 15
35	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser Asp Tyr	
		20 25 30
40	Trp Ile His Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val	
		35 40 45
45	Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
		50 55 60
50	Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr	
		65 70 75 80
55	Leu Gln Met Asn Glu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
		85 90 95
	Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
		100 105 110
	Gly Glu Leu Val Thr Val Ser Ser	
		115 120

5 <210> 52
 <211> 30
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 10 <400> 52

 Glu Glu Gln Leu Val Glu Glu Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser
 20 20 25 30
 20 <210> 53
 <211> 17
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 53
 30 Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 35 Gly

 40 <210> 54
 <211> 32
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 45 <223> Синтетична конструкція
 <400> 54

 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 50 1 5 10 15

 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 55 <210> 55
 <211> 10

<212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 5 <223> Синтетична конструкція

 <400> 55

 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
 10 1 5 10

 <210> 56
 <211> 34
 15 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 20
 <400> 56
 catcagatgg cgggaagatg aagacagatg gtgc
 34

 25
 <210> 57
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 30
 <220>
 <223> Синтетична конструкція

 <400> 57
 35 gccatccaga tgacccagtc tcc
 23

 <210> 58
 40 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 45 <223> Синтетична конструкція

 <400> 58
 ggctgcacca tctgtcttc
 19
 50

 <210> 59
 <211> 107
 <212> БІЛОК
 55 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 59
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 5
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 10
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 15 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 20 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe
 85 90 95
 25 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 30
 <210> 60
 <211> 107
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 60
 40
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 50 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 55 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
 85 90 95
 5
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 10
 <210> 61
 <211> 5
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 15
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 61
 20
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 25
 <210> 62
 <211> 5
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 30
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 62
 35
 Gly Tyr Tyr Met His
 1 5
 40
 <210> 63
 <211> 17
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 45
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 63
 50
 Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 55
 <210> 64
 <211> 20

<212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 5 <223> Синтетична конструкція

 <400> 64

 10 Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
 1 5 10 15

 Ala Phe Asp Ile
 20
 15

 <210> 65
 <211> 11
 <212> БІЛОК
 20 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична конструкція

 25 <400> 65

 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 1 5 10
 30
 <210> 66
 <211> 7
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> Синтетична конструкція

 <400> 66
 40
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

 45 <210> 67
 <211> 11
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 50 <220>
 <223> Синтетична конструкція

 <400> 67

 55 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val
 1 5 10

<210> 68
 <211> 129
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 68
 10
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 20 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 25 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 30 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 40 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 45 <210> 69
 <211> 110
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 50 <220>
 <223> Синтетична конструкція
 <400> 69
 55 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

UA 125432 C2

	Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val
				20					25					30		
5	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr
			35					40					45			
10	Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
		50					55					60				
15	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly
	65					70					75					80
20	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	His
				85						90					95	
25	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln		
			100						105					110		

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язує фактор росту ендотелію судин (VEGF), причому вказане антитіло містить наступні шість гіперваріабельних ділянок (HVR):
- (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1);
 - (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7);
 - (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3);
 - 10 (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8);
 - (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і
 - (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10).
2. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що антитіло додатково містить наступні каркасні ділянки (FR) варіабельного (VH) домену важкого ланцюга:
- 15 (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13);
 - (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14);
 - (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і
 - 20 (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16).
3. Антитіло за п. 1 або 2, яке **відрізняється** тим, що антитіло додатково містить наступні FR варіабельного (VL) домену легкого ланцюга:
- (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17);
 - 25 (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPKGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18);
 - (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і
 - (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).
4. Ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язує VEGF, причому вказане антитіло містить:
- 30 (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 99 % ідентичність послідовності амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 11, або
 - (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 99 % ідентичність послідовності амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 12.
5. Антитіло за п. 4, яке **відрізняється** тим, що домен VH додатково містить наступні FR:
- 35 (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13);
 - (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14);
 - (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і
 - 40 (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16).
6. Антитіло за п. 5, яке **відрізняється** тим, що домен VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11.
7. Антитіло за будь-яким з пп. 4-6, яке **відрізняється** тим, що домен VL додатково містить наступні FR:
- 45 (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17);
 - (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPKGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18);
 - (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і
 - 50 (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).
8. Антитіло за п. 7, яке **відрізняється** тим, що домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.
9. Ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язує VEGF, причому вказане антитіло містить:
- 55 (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, і
 - (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.
10. Ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язує VEGF, причому вказане антитіло містить:
- (a) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48, і
 - (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50.
11. Ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язує VEGF, причому вказане антитіло містить:
- 60 (a) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49, і

(b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50.

12. Антитіло за будь-яким з пп. 1-11, яке **відрізняється** тим, що антитіло здатне інгібувати зв'язування VEGF з рецептором VEGF.

5 13. Антитіло за п. 12, яке **відрізняється** тим, що рецептор VEGF являє собою рецептор 1 VEGF (Flt-1).

14. Антитіло за п. 12, яке **відрізняється** тим, що рецептор VEGF являє собою рецептор 2 VEGF (KDR).

15. Антитіло за будь-яким з пп. 1-14, яке **відрізняється** тим, що антитіло зв'язує VEGF людини (hVEGF) з Kd близько 2 нМ або нижче.

10 16. Антитіло за п. 15, яке **відрізняється** тим, що антитіло зв'язує hVEGF з Kd між близько 75 пМ і близько 2 нМ.

17. Антитіло за п. 16, яке **відрізняється** тим, що антитіло зв'язує hVEGF з Kd між близько 75 пМ і близько 600 нМ.

15 18. Антитіло за п. 17, яке **відрізняється** тим, що антитіло зв'язує hVEGF з Kd між близько 75 пМ і близько 500 нМ.

19. Антитіло за п. 18, яке **відрізняється** тим, що антитіло зв'язує hVEGF з Kd близько 60 пМ.

20. Антитіло за будь-яким з пп. 1-19, яке **відрізняється** тим, що антитіло має температуру плавлення (Tm) більш ніж близько 83,5 °C.

20 21. Антитіло за п. 20, яке **відрізняється** тим, що антитіло має Tm від близько 85 °C до близько 91 °C.

22. Антитіло за п. 21, яке **відрізняється** тим, що антитіло має Tm близько 89 °C.

23. Антитіло за будь-яким з пп. 1-22, яке **відрізняється** тим, що антитіло є моноклональним, людським, гуманізованим або химерним.

25 24. Антитіло за будь-яким з пп. 1-23, яке **відрізняється** тим, що антитіло являє собою фрагмент антитіла, який зв'язує VEGF.

25. Антитіло за п. 24, яке **відрізняється** тим, що фрагмент антитіла вибраний з групи, що складається з Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂-фрагментів.

26. Антитіло за п. 25, яке **відрізняється** тим, що фрагмент антитіла являє собою Fab.

30 27. Антитіло за будь-яким з пп. 1-26, яке **відрізняється** тим, що антитіло являє собою моноспецифічне антитіло.

28. Антитіло за будь-яким з пп. 1-26, яке **відрізняється** тим, що антитіло являє собою мультиспецифічне антитіло.

29. Антитіло за п. 28, яке **відрізняється** тим, що мультиспецифічне антитіло являє собою біспецифічне антитіло.

35 30. Антитіло за п. 29, яке **відрізняється** тим, що біспецифічне антитіло зв'язує VEGF і другу біологічну молекулу, вибрану з групи, що складається з IL-1β; інтерлейкіну-6 (IL-6); рецептора інтерлейкіну-6 (IL-6R); інтерлейкіну-13 (IL-13); рецептора IL-13 (IL-13R); PDGF; ангіопоетину; ангіопоетину 2; Tie2; S1P; інтегринів αvβ3, αvβ5 і α5β1; бетацелюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNFα; HTRA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2 і білка, генетично пов'язаного з ризиком вікової макулярної дегенерації (AMD).

40 31. Антитіло за п. 30, яке **відрізняється** тим, що рецептор VEGF являє собою VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, мембранно-зв'язаний VEGF-рецептор (mbVEGFR) або розчинний рецептор VEGF (sVEGFR).

45 32. Антитіло за п. 30, яке **відрізняється** тим, що білок, генетично зв'язаний з ризиком AMD, вибраний з групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора B, фактора H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; інтерлейкіну-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1 і TNFRSF10A.

33. Полінуклеотид, що кодує антитіло за будь-яким з пп. 1-32.

34. Вектор, що містить полінуклеотид за п. 33.

50 35. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 34.

36. Спосіб отримання антитіла за будь-яким з пп. 1-32, що включає культивування клітини-хазяїна, яка містить вектор за п. 34, та виділення антитіла.

37. Спосіб за п. 36, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн є прокаріотичною.

38. Спосіб за п. 37, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн являє собою Escherichia coli.

55 39. Спосіб за п. 38, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн є еукаріотичною.

40. Спосіб за п. 39, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн являє собою клітину 293, клітину CHO, дріжджову клітину або рослинну клітину.

41. Застосування антитіла за будь-яким із пп. 1-32 для зменшення або інгібування ангіогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом.

42. Застосування за п. 41, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою окулярний розлад або клітинний проліферативний розлад.

43. Застосування за п. 42, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою окулярний розлад.

5 44. Застосування за п. 43, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад вибирають з групи, яка складається з вікової макулярної дегенерації (AMD), макулярної дегенерації, набряку макули, діабетичного макулярного набряку (DME) (включаючи фокальний, нецентральный DME і дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатії, діабетичної ретинопатії (DR) (включаючи проліферативну DR (PDR), непроліферативну DR (NPDR) і висотну DR), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ретинопатії недоношених (ROP), оклюзії вени сітківки (RVO) (включаючи центральні (CRVO) і розгалужені (BRVO) форми), CNV (хоріоїдальна неоваскуляризація) (включаючи міопічну CNV), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацією сітківки, хвороби, пов'язаної з ретинальною/хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічної короткозорістю, хвороби фон Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу ока, сімейної ексудативної вітреоретинопатії (FEVR), хвороби Коутса, хвороби Норрі, синдрому остеопорозу-псевдогліоми (OPPG), субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярного захворювання очей, неоваскулярної глаукоми, пігментної дистрофії сітківки (RP), гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангиоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, кістозного макулярного набряку (CME), васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (включаючи інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційні (наприклад, алергічний) кон'юнктивіти), вродженого амарозу Лебера, увеїту (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдиту, очного гістоплазмозу, блефариту, сухості очей, травматичного пошкодження очей і хвороби Шегрена.

25 45. Застосування за п. 44, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад являє собою AMD, DME, DR або RVO.

46. Застосування за п. 44 або 45, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад являє собою AMD.

30 47. Застосування за будь-яким з пп. 44-46, яке **відрізняється** тим, що AMD являє собою вологу AMD.

48. Застосування за п. 42, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою клітинний проліферативний розлад.

49. Застосування за п. 48, яке **відрізняється** тим, що клітинний проліферативний розлад являє собою рак.

35 50. Застосування за п. 49, яке **відрізняється** тим, що рак вибирають з групи, що складається з раку молочної залози, раку товстої кишки, недрібноклітинного раку легені, неходжкінської лімфому (НХЛ), раку нирки, раку передміхурової залози, раку печінки, раку голови і шиї, меланоми, раку яєчників, мезотеліоми і множинної мієломи.

40 51. Застосування антитіла за будь-яким із пп. 1-32 для лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом.

52. Застосування за п. 51, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою окулярний розлад або клітинний проліферативний розлад.

53. Застосування за п. 52, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою окулярний розлад.

45 54. Застосування за п. 53, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад вибирають з групи, що складається з AMD, макулярної дегенерації, набряку макули, DME (включаючи фокальний, нецентральный DME і дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатії, DR (включаючи PDR, NPDR і висотну DR), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ROP, RVO (включаючи CRVO і BRVO форми), CNV (включаючи міопічну CNV), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризації сітківки, хвороби, пов'язаної з ретинальною/хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічної короткозорості, хвороби фон Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очей, FEVR, хвороби Коутса, хвороби Норрі, OPPG, субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярного захворювання очей, неоваскулярної глаукоми, RP, гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангиоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, CME, васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (включаючи інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіти), вродженого амарозу Лебера, увеїту (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдиту, очного гістоплазмозу, блефариту, сухості очей, травматичного пошкодження очей і хвороби Шегрена.

55. Застосування за п. 54, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад являє собою AMD, DME, DR або RVO.
56. Застосування за п. 54 або 55, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад являє собою AMD.
- 5 57. Застосування за будь-яким з пп. 54-56, яке **відрізняється** тим, що AMD являє собою вологу AMD.
58. Застосування за п. 52, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою клітинний проліферативний розлад.
- 10 59. Застосування за п. 58, яке **відрізняється** тим, що клітинний проліферативний розлад являє собою рак.
60. Застосування за п. 59, яке **відрізняється** тим, що рак вибирають з групи, що складається з раку молочної залози, раку товстої кишки, недрібноклітинного раку легені, неходжкінської лімфоми (НХЛ), раку нирки, раку передміхурової залози, раку печінки, раку голови і шиї, меланому, раку яєчників, мезотеліому і множинної мієломи.
- 15 61. Застосування за будь-яким з пп. 41-60, яке **відрізняється** тим, що антитіло призначене для введення з другим агентом, причому другий агент вибраний з групи, що складається з другого антитіла, хіміотерапевтичного агента, цитотоксичного агента, антиангіогенного агента, імунодепресивного агента, проліків, цитокину, антагоніста цитокінів, цитотоксичної променевої терапії, кортикостероїда, протиблювотного, протиракової вакцини, анальгетика, агента, який
- 20 інгібує ріст, і сполуки, яка зв'язується з другою біологічною молекулою.
62. Застосування за п. 61, яке **відрізняється** тим, що антиангіогенний агент являє собою антагоніст VEGF.
63. Застосування за п. 62, яке **відрізняється** тим, що антагоніст VEGF являє собою анти-VEGF антитіло, антитіло проти рецептора VEGF, розчинний злитий білок рецептора VEGF, аптамер, анти-VEGF DARPIn® або інгібітор тирозинкінази VEGFR.
- 25 64. Застосування за п. 63, яке **відрізняється** тим, що анти-VEGF антитіло являє собою ранібізумаб (LUCENTIS®), RTH-258 або біспецифічне анти-VEGF антитіло.
65. Застосування за п. 64, яке **відрізняється** тим, що біспецифічне анти-VEGF антитіло являє собою анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло.
- 30 66. Застосування за п. 65, яке **відрізняється** тим, що анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло являє собою RG-7716.
67. Застосування за п. 63, яке **відрізняється** тим, що розчинний злитий білок рецептора VEGF являє собою афліберцепт (EYLEA®).
- 35 68. Застосування за п. 63, яке **відрізняється** тим, що аптамер являє собою пегаптаніб (MACUGEN®).
69. Застосування за п. 63, яке **відрізняється** тим, що анти-VEGF DARPIn® являє собою абіципар пегол.
70. Застосування за п. 63, яке **відрізняється** тим, що інгібітор тирозинкінази VEGFR вибирають з групи, що складається з 4-(4-бром-2-фтораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси)хіназоліну (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідін-1-ілпропокси) хіназоліну (AZD2171), ваталаніб (PTK787), семаксамібін (SU5416) і SUTENT® (сунітиніб).
- 40 71. Застосування за п. 61, яке **відрізняється** тим, що друга біологічна молекула вибрана з групи, яка складається з IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; ангиопоетину; ангиопоетину 2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ і $\alpha 5\beta 1$; бетацелюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNF α ; HtrA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2 і білка, генетично пов'язаного з ризиком AMD.
- 45 72. Застосування за п. 71, яке **відрізняється** тим, що рецептор VEGF являє собою VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR або sVEGFR.
- 50 73. Застосування за п. 71, яке **відрізняється** тим, що білок, генетично зв'язаний з ризиком AMD, вибраний з групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора В, фактора Н, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LPC; COL10A1 і TNFRSF10A.
74. Застосування за будь-яким з пп. 61 і 71-73, яке **відрізняється** тим, що сполука, яка зв'язує другу біологічну молекулу, являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.
- 55 75. Застосування за п. 74, яке **відрізняється** тим, що фрагмент антигензв'язуючого антитіла вибраний з групи, що складається з Fab, Fab'-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂-фрагментів.
76. Застосування за будь-яким з пп. 41-75, яке **відрізняється** тим, що антитіло призначене для введення інтравітреально, окулярно, внутрішньоочно, навколосклерально, субтенонально, суперхороїдально, місцево, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрішньошкірно,
- 60

- черезшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньочеревно, внутрішньоочагово, інтракраніально, внутрішньосуглобово, внутрішньопростатично, внутрішньоплеврально, інтратрахеально, інтратекально, інтраназально, інтравагінально, інтраректально, місцево, внутрішньопухлинно, внутрішньоочеревно, перитонеально, інтравентрикулярно, підшкірно, субкон'юнктивно, інтравезикулярно, крізь слизову, інтраперикардіально, внутрішньопуповинно, інтраорбітально, перорально, трансдермально, шляхом інгаляції, шляхом ін'єкції, очними краплями, шляхом імплантації, шляхом інфузії, шляхом безперервної інфузії, локалізованими перфузійним ваннами, які діють на клітини безпосередньо, катетером, промиванням, кремами або ліпідними композиціями.
77. Застосування за п. 76, яке **відрізняється** тим, що антитіло призначене для введення інтравітреально, окулярно, інтраокулярно, навколосклерально, субтенонально, суперхороїдально або місцево.
78. Застосування за п. 77, яке **відрізняється** тим, що антитіло призначене для введення інтравітреально шляхом ін'єкції.
79. Застосування за п. 77, яке **відрізняється** тим, що антитіло призначене для введення місцево за допомогою очних крапель або мазі.
80. Застосування за п. 76 або 77, яке **відрізняється** тим, що антитіло призначене для введення пристроєм доставки - портом.
81. Застосування за будь-яким з пп. 51-80, яке **відрізняється** тим, що суб'єкт являє собою людину.
82. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло за будь-яким з пп. 1-32.
83. Фармацевтична композиція за п. 82, яка додатково містить полімер.
84. Фармацевтична композиція за п. 83, яка **відрізняється** тим, що полімер являє собою біорозкладаний полімер.
85. Фармацевтична композиція за п. 83, яка **відрізняється** тим, що фармацевтична композиція складена у вигляді депо полімерного розчинника, полімерного імплантату або полімерної міцели.
86. Фармацевтична композиція за будь-яким з пп. 83-85, яка **відрізняється** тим, що полімер являє собою співполімер полігліколевої кислоти (PLGA) полімолочної кислоти.
87. Фармацевтична композиція за п. 86, яка **відрізняється** тим, що фармацевтична композиція складена у вигляді стрижня PLGA.
88. Застосування фармацевтичної композиції за будь-яким з пп. 82-87 для лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангіогенезом, або розладу, пов'язаного з небажаною проникністю судин у ссавця.
89. Застосування за п. 88, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, являє собою окулярний розлад або клітинний проліферативний розлад.
90. Застосування за п. 89, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з патологічним ангіогенезом, являє собою окулярний розлад.
91. Застосування за п. 90, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад вибирають з групи, що складається з AMD, макулярної дегенерації, набряку макули, DME (включаючи фокальний, нецентральної DME і дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатії, DR (включаючи PDR, NPDR і висотну DR), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ROP, RVO (включаючи CRVO і BRVO форми), CNV (включаючи міопічну CNV), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризації сітківки, хвороби, пов'язаної з ретинальною/хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічної короткозорості, хвороби фон Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очей, FEVR, хвороби Коутса, хвороби Норрі, OPPG, субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярного захворювання очей, неоваскулярної глаукоми, RP, гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангіоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, CME, васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (включаючи інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт), вродженого амарозу Лебера, увеїту (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдиту, очного гістоплазмозу, блефариту, сухості очей, травматичного пошкодження очей і хвороби Шегрена.
92. Застосування за п. 91, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад являє собою AMD, DME, DR або RVO.
93. Застосування за п. 91 або 92, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад являє собою AMD.
94. Застосування за будь-яким з пп. 91-93, яке **відрізняється** тим, що AMD являє собою вологу AMD.

95. Застосування за п. 89, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою клітинний проліферативний розлад.
96. Застосування за п. 95, яке **відрізняється** тим, що клітинний проліферативний розлад являє собою рак.
- 5 97. Застосування за п. 96, яке **відрізняється** тим, що рак вибирають з групи, що складається з раку молочної залози, раку товстої кишки, недрібноклітинного раку легені, неходжкінської лімфоми (НХЛ), раку нирки, раку передміхурової залози, раку печінки, раку голови і шиї, меланоми, раку яєчників, мезотеліоми і множинної мієломи.
- 10 98. Застосування за п. 88, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з небажаною проникністю судин, вибирається з групи, що складається з набряку, пов'язаного з пухлинами головного мозку, асцити, асоційованого із злоякісними новоутвореннями, синдрому Мейгена, запалення легенів, нефротичного синдрому, перикардіального випоту, плеврального випоту і проникності, пов'язаної з серцево-судинними захворюваннями.
- 15 99. Застосування за будь-яким з пп. 88-98, яке **відрізняється** тим, що фармацевтична композиція містить другий агент, який **відрізняється** тим, що другий агент вибраний з групи, що складається з другого антитіла, хіміотерапевтичного агента, цитотоксичного агента, антиангіогенного агента, імунодепресивного агента, проліків, цитокіну, антагоніста цитокінів, цитотоксичної променевої терапії, кортикостероїда, протиблювотного, протиракової вакцини, анальгетика, агента, який інгібує ріст, і сполуки, яка зв'язується з другою біологічною
- 20 молекулою.
100. Застосування за п. 99, яке **відрізняється** тим, що антиангіогенний агент являє собою антагоніст VEGF.
101. Застосування за п. 100, яке **відрізняється** тим, що антагоніст VEGF являє собою анти-VEGF антитіло, антитіло проти рецептора VEGF, розчинний злитий білок рецептора VEGF, аптамер, анти-VEGF DARPIn® або інгібітор тирозинкінази VEGFR.
- 25 102. Застосування за п. 101, яке **відрізняється** тим, що анти-VEGF антитіло являє собою ранібізумаб (LUCENTIS®), RTH-258 або біспецифічне анти-VEGF антитіло.
103. Застосування за п. 102, яке **відрізняється** тим, що біспецифічне анти-VEGF антитіло являє собою анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло.
- 30 104. Застосування за п. 103, яке **відрізняється** тим, що анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло являє собою RG-7716.
105. Застосування за п. 101, яке **відрізняється** тим, що розчинний злитий білок рецептора VEGF являє собою афліберцепт (EYLEA®).
106. Застосування за п. 101, яке **відрізняється** тим, що аптамери являє собою пегаптаніб (MACUGEN®).
- 35 107. Застосування за п. 101, яке **відрізняється** тим, що анти-VEGF DARPIn® являє собою абіципар пегол.
108. Застосування за п. 101, яке **відрізняється** тим, що інгібітор тирозинкінази VEGFR вибирають з групи, що складається з 4-(4-бром-2-фтораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси)хіназоліну (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідин-1-ілпропокси)хіназоліну (AZD2171), ваталанібу (PTK787), семаксамібіну (SU5416) і SUTENT® (сунітиніб).
- 40 109. Застосування за п. 99, яке **відрізняється** тим, що друга біологічна молекула вибрана з групи, яка складається з IL-1β; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; ангиопоетину; ангиопоетину 2; Tie2; S1P; інтегринів αvβ3, αvβ5 і α5β1; бетацелюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNFα; HtrA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2 і білка, генетично пов'язаного з ризиком AMD.
- 45 110. Застосування за п. 109, яке **відрізняється** тим, що рецептор VEGF являє собою VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR або sVEGFR.
- 50 111. Застосування за п. 109, яке **відрізняється** тим, що білок, генетично зв'язаний з ризиком AMD, вибраний з групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора B, фактора H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1 і TNFRSF10A.
112. Застосування за будь-яким з пп. 99 і 109-111, яке **відрізняється** тим, що сполука, яка зв'язує другу біологічну молекулу, являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.
- 55 113. Застосування за п. 112, яке **відрізняється** тим, що фрагмент антигензв'язуючого антитіла вибраний з групи, що складається з Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂-фрагментів.
114. Кон'югат антитіла, що містить (i) антитіло за будь-яким з пп. 1-32 і (ii) гідрофільний полімер, ковалентно приєднаний до антитіла.

115. Кон'югат антитіла за п. 114, який **відрізняється** тим, що гідрофільний полімер являє собою полімер гіалуронової кислоти (НА) або полімер поліетиленгліколю (ПЕГ).
116. Кон'югат антитіла за п. 115, який **відрізняється** тим, що гідрофільний полімер являє собою НА-полімер.
- 5 117. Кон'югат антитіла за п. 116, який **відрізняється** тим, що полімер НА має молекулярну масу близько 1 мільйона дальтон (МДа) або нижче.
118. Кон'югат антитіла за п. 117, який **відрізняється** тим, що полімер НА має молекулярну масу між близько 25 кДа і близько 500 кДа.
119. Кон'югат антитіла за п. 118, який **відрізняється** тим, що полімер НА має молекулярну масу між близько 100 кДа і близько 250 кДа.
- 10 120. Кон'югат антитіла за п. 119, який **відрізняється** тим, що полімер НА має молекулярну масу близько 200 кДа.
121. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 114-120, який **відрізняється** тим, що полімер НА не є зшитим.
- 15 122. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 114-121, який **відрізняється** тим, що антитіло являє собою фрагмент антитіла, який зв'язує VEGF.
123. Кон'югат антитіла за п. 122, який **відрізняється** тим, що фрагмент антитіла вибрано з групи, що складається з Fab, Fab-C, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂-фрагментів.
124. Кон'югат антитіла за п. 123, який **відрізняється** тим, що фрагмент антитіла являє собою Fab, Fab-C або Fab'.
- 20 125. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 114-124 який **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус між близько 10 нм і близько 60 нм.
126. Кон'югат антитіла за п. 125, який **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус між близько 25 нм і близько 35 нм.
- 25 127. Кон'югат антитіла за п. 126, який **відрізняється** тим, що гідродинамічний радіус становить близько 28 нм.
128. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 114-127, який **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла має окулярний період напіввиведення, який збільшено щодо еталонного антитіла, яке не ковалентно приєднано до гідрофільного полімера.
- 30 129. Кон'югат антитіла за п. 128, який **відрізняється** тим, що окулярний період напіввиведення збільшений щонайменше близько в 2 рази відносно еталонного антитіла.
130. Кон'югат антитіла за п. 129, який **відрізняється** тим, що окулярний період напіввиведення збільшений щонайменше близько в 4 рази відносно еталонного антитіла.
131. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 128-130, який **відрізняється** тим, що окулярний період напіввиведення являє собою вітреальний період напіввиведення.
- 35 132. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 128-131, який **відрізняється** тим, що еталонне антитіло ідентичне антитілу кон'югата антитіла.
133. Кон'югат антитіла за п. 114, який **відрізняється** тим, що антитіло ковалентно приєднано до полімеру за допомогою оборотного пролікарського лінкера.
- 40 134. Кон'югат антитіла за п. 133, який **відрізняється** тим, що полімер являє собою гідрогель.
135. Кон'югат антитіла за п. 134, який **відрізняється** тим, що гідрогель являє собою гідрогель на основі ПЕГ.
136. Кон'югат антитіла за п. 134 або 135, який **відрізняється** тим, що гідрогель має форму мікрочастинки сфери.
- 45 137. Злитий білок, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-32, ковалентно приєднаний до НА-зв'язуючого домену.
138. Злитий білок за п. 137, який **відрізняється** тим, що НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до важкого ланцюга або легкого ланцюга антитіла.
139. Злитий білок за п. 138, який **відрізняється** тим, що НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до С-кінця важкого ланцюга або С-кінця легкого ланцюга.
- 50 140. Злитий білок за п. 139, який **відрізняється** тим, що НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до С-кінця важкого ланцюга.
141. Злитий білок за п. 139, який **відрізняється** тим, що НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до С-кінця легкого ланцюга.
- 55 142. Злитий білок за будь-яким з пп. 137-141, який додатково містить лінкер, при цьому лінкер розташований між антитілом і НА-зв'язуючим доменом.
143. Злитий білок за п. 142, який **відрізняється** тим, що лінкер містить амінокислотну послідовність GGGS (SEQ ID NO: 61).
- 60 144. Злитий білок за п. 143, який **відрізняється** тим, що лінкер складається з амінокислотної послідовності GGGS (SEQ ID NO: 61).

145. Злитий білок за будь-яким з пп. 137-144, який **відрізняється** тим, що антитіло являє собою фрагмент антитіла, який зв'язує VEGF.
146. Злитий білок за п. 145, який **відрізняється** тим, що фрагмент антитіла вибрано з групи, що складається з Fab, Fab-C, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂-фрагментів.
- 5 147. Злитий білок за п. 146, який **відрізняється** тим, що фрагмент антитіла являє собою Fab.
148. Злитий білок за п. 147, який **відрізняється** тим, що НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до С-кінця CH1 домену Fab.
149. Злитий білок за п. 147, який **відрізняється** тим, що НА-зв'язуючий білок ковалентно приєднаний до С-кінця CL домену Fab.
- 10 150. Злитий білок за будь-яким з пп. 137-149, який **відрізняється** тим, що НА-зв'язуючий домен вибрано з групи, що складається з модуля зв'язку, домену G1 і багатого на лізин олігопептиду.
151. Злитий білок за п. 150, який **відрізняється** тим, що НА-зв'язуючий домен є модулем зв'язку.
152. Злитий білок за п. 151, який **відрізняється** тим, що модуль зв'язку вибирають з групи, що складається з гена 6, стимульованого фактором некрозу пухлини (TSG6), CD44, рецептора гіалуронової кислоти ендотелію лімфатичних судин 1 (LYVE-1), білка, який зв'язує гіалуронову кислоту і протеоглікан (HAPLN) 1, HAPLN2, HAPLN3, HAPLN4, агрекану, бревікану, нейрокану, фосфакану, версикану, CAB61358, KIA0527, модулів зв'язку стабілін-1 і стабілін-2.
153. Злитий білок за п. 152, який **відрізняється** тим, що модуль зв'язку являє собою модуль зв'язку TSG6.
- 20 154. Злитий білок за п. 153, який **відрізняється** тим, що модуль зв'язку TSG6 являє собою модуль зв'язку TSG6 людини або модуль зв'язку TSG6 кролика.
155. Злитий білок за п. 154, який **відрізняється** тим, що модуль зв'язку TSG являє собою модуль зв'язку TSG6 людини.
- 25 156. Злитий білок за п. 155, який **відрізняється** тим, що модуль зв'язку TSG6 людини містить амінокислотні залишки 36-128 TSG6 людини.
157. Злитий білок за будь-яким з пп. 137-156, додатково містить щонайменше один додатковий НА-зв'язуючий домен.
158. Злитий білок за п. 157, який **відрізняється** тим, що щонайменше один додатковий НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до важкого ланцюга або легкого ланцюга антитіла.
- 30 159. Злитий білок за п. 157 або 158, який **відрізняється** тим, що щонайменше один додатковий НА-зв'язуючий білок пов'язаний з антитілом за допомогою лінкера.
160. Злитий білок за п. 159, який **відрізняється** тим, що лінкер містить амінокислотну послідовність GGGGS (SEQ ID NO: 61).
- 35 161. Злитий білок за п. 160, який **відрізняється** тим, що лінкер складається з амінокислотної послідовності GGGGS (SEQ ID NO: 61).
162. Злитий білок за будь-яким з пп. 157-161, який **відрізняється** тим, що перший НА-зв'язуючий домен ковалентно приєднаний до важкого ланцюга, а другий зв'язує НА домен ковалентно приєднаний до легкого ланцюга.
- 40 163. Злитий білок за п. 162, який **відрізняється** тим, що перший НА-зв'язуючий домен з'єднаний з С-кінцем важкого ланцюга, а другий НА-зв'язуючий домен з'єднаний з С-кінцем легкого ланцюга.
164. Злитий білок за будь-яким з пп. 157-163, який **відрізняється** тим, що щонайменше один додатковий НА-зв'язуючий білок вибирають з групи, що складається з модуля зв'язку, домену G1 і багатого на лізин олігопептиду.
- 45 165. Злитий білок за п. 164, який **відрізняється** тим, що щонайменше один додатковий НА-зв'язуючий білок є модулем зв'язку.
166. Злитий білок за п. 165, який **відрізняється** тим, що модуль зв'язку являє собою модуль зв'язку TSG6.
- 50 167. Злитий білок за п. 166, який **відрізняється** тим, що модуль зв'язку TSG6 являє собою модуль зв'язку TSG6 людини або модуль зв'язку TSG6 кролика.
168. Злитий білок за п. 167, який **відрізняється** тим, що модуль зв'язку TSG6 являє собою модуль зв'язку TSG6 людини.
169. Злитий білок за п. 167 або п. 168, який **відрізняється** тим, що модуль зв'язку TSG6 людини містить амінокислотні залишки 36-128 TSG6 людини.
- 55 170. Злитий білок за будь-яким з пп. 137-169, який **відрізняється** тим, що злитий білок специфічно зв'язується з VEGF і НА.
171. Злитий білок за п. 170, який **відрізняється** тим, що злитий білок зв'язує НА з Kd близько 2 мкМ або нижче.

172. Злитий білок за п. 171, який **відрізняється** тим, що злитий білок зв'язує НА з Kd між близько 1 нМ і близько 500 нМ.
173. Злитий білок за п. 172, який **відрізняється** тим, що злитий білок зв'язує НА з Kd між близько 1 нМ і близько 50 нМ.
- 5 174. Злитий білок за п. 173, який **відрізняється** тим, що злитий білок зв'язує НА з Kd близько 10 нМ.
175. Злитий білок за будь-яким з пп. 137-174, який **відрізняється** тим, що злитий білок має окулярний період напіввиведення, який збільшений в порівнянні з еталонним антитілом, яке ковалентно приєднано до НА-зв'язуючого домену.
- 10 176. Злитий білок за п. 175, який **відрізняється** тим, що період окулярного напіввиведення збільшений щонайменше близько в 2 рази відносно еталонного антитіла.
177. Злитий білок за п. 176, який **відрізняється** тим, що період окулярного напіввиведення збільшений щонайменше близько в 4 рази відносно еталонного антитіла.
- 15 178. Злитий білок за будь-яким з пп. 175-177, який **відрізняється** тим, що окулярний період напіввиведення являє собою вітреальний період напіввиведення.
179. Злитий білок за будь-яким з пп. 175-178, який **відрізняється** тим, що еталонне антитіло ідентичне антитілу злитого білка.
180. Застосування кон'югату антитіла за будь-яким із пп. 114-136 для зменшення або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, що має розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом.
- 20 181. Застосування кон'югату антитіла за будь-яким із пп. 114-136 для лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом.
182. Застосування за п. 180 або 181, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою окулярний розлад.
183. Застосування за п. 182, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад вибирають з групи, що складається з AMD, макулярної дегенерації, набряку макули, DME (включаючи фокальний, нецентральний DME і дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатії, DR (включаючи PDR, NPDR і висотну DR), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ROP, RVO (включаючи CRVO і BRVO форми), CNV (включаючи міопічну CNV), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризації сітківки, хвороби, пов'язаної з ретинальною/хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічної короткозорості, хвороби фон Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очей, FEVR, хвороби Коутса, хвороби Норрі, OPPG, субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярного захворювання очей, неоваскулярної глаукоми, RP, гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангиоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, CME, васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (включаючи інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіти), вродженого амарозу Лебера, увеїту (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдиту, очного гістоплазмозу, блефариту, сухості очей, травматичного пошкодження очей і хвороби Шегрена.
- 30 184. Застосування за п. 183, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад являє собою AMD, DME, DR або RVO.
185. Застосування за п. 184, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад являє собою AMD.
186. Застосування за будь-яким з пп. 183-185, яке **відрізняється** тим, що AMD являє собою вологу AMD.
- 45 187. Застосування за будь-яким з пп. 180-186, яке **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла призначений для введення з другим агентом, причому другий агент вибрано з групи, що складається з іншого антитіла, антиангіогенного агента, цитокіну, антагоніста цитокінів, кортикостероїда, анальгетика і з'єднання, яке зв'язується з другою біологічною молекулою.
188. Застосування за п. 187, яке **відрізняється** тим, що антиангіогенний агент являє собою антагоніст VEGF.
- 50 189. Застосування за п. 188, яке **відрізняється** тим, що антагоніст VEGF являє собою анти-VEGF антитіло, антитіло проти рецептора VEGF, розчинний злитий білок рецептора VEGF, аптамер, анти-VEGF DARPIn® або інгібітор тирозинкінази VEGFR.
190. Застосування за п. 189, яке **відрізняється** тим, що анти-VEGF антитіло являє собою ранібізумаб (LUCENTIS®), RTH-258 або біспецифічне анти-VEGF антитіло.
- 55 191. Застосування за п. 190, яке **відрізняється** тим, що біспецифічне анти-VEGF антитіло являє собою анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло.
192. Застосування за п. 191, яке **відрізняється** тим, що анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло являє собою RG-7716.

193. Застосування за п. 189, яке **відрізняється** тим, що розчинний злитий білок рецептора VEGF являє собою афліберцепт (EYLEA®).

194. Застосування за п. 189, яке **відрізняється** тим, що аптамер являє собою пегаптаніб (MACUGEN®).

5 195. Застосування за п. 189, яке **відрізняється** тим, що анти-VEGF DARPIn® являє собою абіципар пегол.

196. Застосування за п. 189, яке **відрізняється** тим, що інгібітор тирозинкінази VEGFR вибирають з групи, що складається з 4-(4-бром-2-фтораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси)хіназоліну (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідін-1-ілпропоксі) хіназоліну (AZD2171), ваталанібу (PTK787), семаксамібіну (SU5416) і SUTENT® (сунітиніб).

197. Застосування за п. 187, яке **відрізняється** тим, що друга біологічна молекула вибрана з групи, яка складається з IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; ангіопоетину; ангіопоетину 2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ і $\alpha 5\beta 1$; бетацелюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNF α ; HtrA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2 і білка, генетично пов'язаного з ризиком AMD.

198. Застосування за п. 197, яке **відрізняється** тим, що рецептор VEGF являє собою VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR або sVEGFR.

199. Застосування за п. 197, яке **відрізняється** тим, що білок, генетично зв'язаний з ризиком AMD, вибраний з групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора В, фактора Н, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1 і TNFRSF10A.

200. Застосування за будь-яким з пп. 187 і 197-199, яке **відрізняється** тим, що сполука, яка зв'язує другу біологічну молекулу, являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

201. Застосування за п. 200, яке **відрізняється** тим, що фрагмент антигензв'язуючого антитіла вибраний з групи, що складається з Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂-фрагментів.

202. Застосування за будь-яким з пп. 180-201, яке **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла призначений для введення інтравітреально, окулярно, внутрішньоочно, навколосклерально, субтенонально, суперхороїдально, місцево, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрішньошкірно, черезшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньоочередно, внутрішньовогнищево, інтракраніально, внутрішньосуглобово, внутрішньопростатично, внутрішньоплеврально, інтратрахеально, інтратекально, інтраназально, інтравагінально, інтраректально, місцево, внутрішньопухлинно, внутрішньоочередно, перитонеально, інтравентрикулярно, підшкірно, субкон'юктивно, інтравезикулярно, крізь слизову, інтраперикардіально, внутрішньопуповинно, інтраорбітально, перорально, трансдермально, шляхом інгаляції, шляхом ін'єкції, очними краплями, шляхом імплантації, шляхом інфузії, шляхом безперервної інфузії, локалізованим перфузійним ваннами, які діють на клітини безпосередньо, катетером, промиванням, кремами або ліпідними композиціями.

203. Застосування за п. 202, яке **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла призначений для введення інтравітреально, окулярно, інтраокулярно, навколосклерально, субтенонально, суперхороїдально або місцево.

204. Застосування за п. 203, яке **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла призначений для введення інтравітреально шляхом ін'єкції.

205. Застосування за п. 203, яке **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла призначений для введення місцево за допомогою очних крапель або мазі.

206. Застосування за п. 202 або 203, яке **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла призначений для введення пристроєм доставки - портом.

207. Фармацевтична композиція, яка містить кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 114-136.

208. Застосування фармацевтичної композиції за п. 207 для лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом у ссавця.

209. Застосування за п. 208, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою окулярний розлад.

210. Застосування за п. 209, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад вибирають з групи, що складається з AMD, макулярної дегенерації, набряку макули, DME (включаючи фокальний, нецентральный DME і дифузний, пов'язаний з центром DME), ретинопатії, DR (включаючи PDR, NPDR і висотну DR), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ROP, RVO (включаючи CRVO і BRVO форми), CNV (включаючи міопічну CNV), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризації сітківки, хвороби, пов'язаної з ретинальною/хороїдальною неоваскуляризацією, патологічної короткозорості, хвороби фон Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очей, FEVR, хвороби Коутса, хвороби Норрі, OPPG,

субкон'юнктивального крововиливу, рубцеозу, неоваскулярного захворювання очей, неоваскулярної глаукоми, RP, гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангіоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, СМЕ, васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (включаючи інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт), вродженого амарозу Лебера, увеїту (включаючи інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдиту, очного гістоплазмозу, блефариту, сухості очей, травматичного пошкодження очей і хвороби Шегрена.

211. Застосування за п. 210, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад являє собою AMD, DME, DR або RVO.

212. Застосування за п. 210 або 211, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад являє собою AMD.

213. Застосування за будь-яким з пп. 210-212, яке **відрізняється** тим, що AMD являє собою вологу AMD.

214. Застосування за будь-яким з пп. 207-213, яке **відрізняється** тим, що фармацевтична композиція додатково містить другий агент, причому другий агент вибрано з групи, що складається з іншого антитіла, антиангіогенного агента, цитокіну, антагоніста цитокінів, кортикостероїда, анальгетика і сполуки, яка зв'язується з другою біологічною молекулою.

215. Застосування за п. 214, яке **відрізняється** тим, що антиангіогенний агент являє собою антагоніст VEGF.

216. Застосування за п. 215, яке **відрізняється** тим, що антагоніст VEGF являє собою анти-VEGF антитіло, антитіло проти рецептора VEGF, розчинний злитий білок рецептора VEGF, аптамер, анти-VEGF DARPIn® або інгібітор тирозинкінази VEGFR.

217. Застосування за п. 216, яке **відрізняється** тим, що анти-VEGF антитіло являє собою ранібізумаб (LUCENTIS®), RTH-258 або біспецифічне анти-VEGF антитіло.

218. Застосування за п. 217, яке **відрізняється** тим, що біспецифічне анти-VEGF антитіло являє собою анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло.

219. Застосування за п. 218, яке **відрізняється** тим, що анти-VEGF/анти-Ang2 антитіло являє собою RG-7716.

220. Застосування за п. 216, яке **відрізняється** тим, що розчинний злитий білок рецептора VEGF являє собою афліберцепт (EYLEA®).

221. Застосування за п. 216, яке **відрізняється** тим, що аптамери являє собою пегаптаніб (MACUGEN®).

222. Застосування за п. 216, яке **відрізняється** тим, що анти-VEGF DARPIn® являє собою абіципар пегол.

223. Застосування за п. 216, яке **відрізняється** тим, що інгібітор тирозинкінази VEGFR вибирають з групи, що складається з 4-(4-бром-2-фтораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси)хіназоліну (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідин-1-ілпропокси)хіназоліну (AZD2171), ваталаніб (PTK787), семаксамібіну (SU5416) і SUTENT® (сунітиніб).

224. Застосування за п. 214, яке **відрізняється** тим, що друга біологічна молекула вибрана з групи, яка складається з IL-1β; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; ангіопоетину; ангіопоетину 2; Tie2; S1P; інтегринів αvβ3, αvβ5 і α5β1; бетацелюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора комплементу D; TNFα; HtrA1; рецептора VEGF; рецептора ST-2 і білка, генетично пов'язаного з ризиком AMD.

225. Застосування за п. 224, яке **відрізняється** тим, що рецептор VEGF являє собою VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR або sVEGFR.

226. Застосування за п. 224, яке **відрізняється** тим, що білок, генетично зв'язаний з ризиком AMD, вибраний з групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора B, фактора H, CFHR3, C3b, C5, C5a і C3a; HTRA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; C5P; LIPC, COL10A1 і TNFRSF10A.

227. Застосування за будь-яким з пп. 214, 225 або 226, яке **відрізняється** тим, що сполука, яка зв'язує другу біологічну молекулу, являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

228. Застосування за п. 227, яке **відрізняється** тим, що фрагмент антигензв'язуючого антитіла вибраний з групи, що складається з Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂-фрагментів.

229. Кон'югат антитіла, що містить (i) антитіло, яке специфічно зв'язує VEGF, і (ii) полімер HA, ковалентно приєднаний до антитіла, причому полімер HA має молекулярну масу приблизно 200 МДа і не є зшитим, причому антитіло містить:

(a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11; і

(b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

230. Кон'югат антитіла, що містить (i) антитіло, яке специфічно зв'язує VEGF і (ii) полімер НА, ковалентно приєднаний до антитіла, причому полімер НА має молекулярну масу приблизно 200 МДа і не є зшитим, причому антитіло містить:

- (a) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48 або SEQ ID NO: 49, і
 (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50.

231. Кон'югат антитіла, що містить:

(i) антитіло, яке специфічно зв'язує VEGF, і

(ii) полімер НА, ковалентно приєднаний до антитіла, причому полімер НА має молекулярну масу приблизно 100 МДа і не є зшитим, причому антитіло містить:

(a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11; і

(b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12;

(iii) антитіло, яке специфічно зв'язує VEGF, і (ii) полімер НА, ковалентно приєднаний до антитіла, причому полімер НА має молекулярну масу приблизно 150 МДа і не є зшитим, причому антитіло містить:

(a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11; і

(b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12; або

(iv) антитіло, яке специфічно зв'язує VEGF і (vi) полімер НА, ковалентно приєднаний до антитіла, причому полімер НА має молекулярну масу приблизно 250 МДа і не є зшитим, причому антитіло містить:

(a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11; і

(b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

232. Фармацевтична композиція, що містить кон'югат антитіла за будь-яким із пп. 229-231.

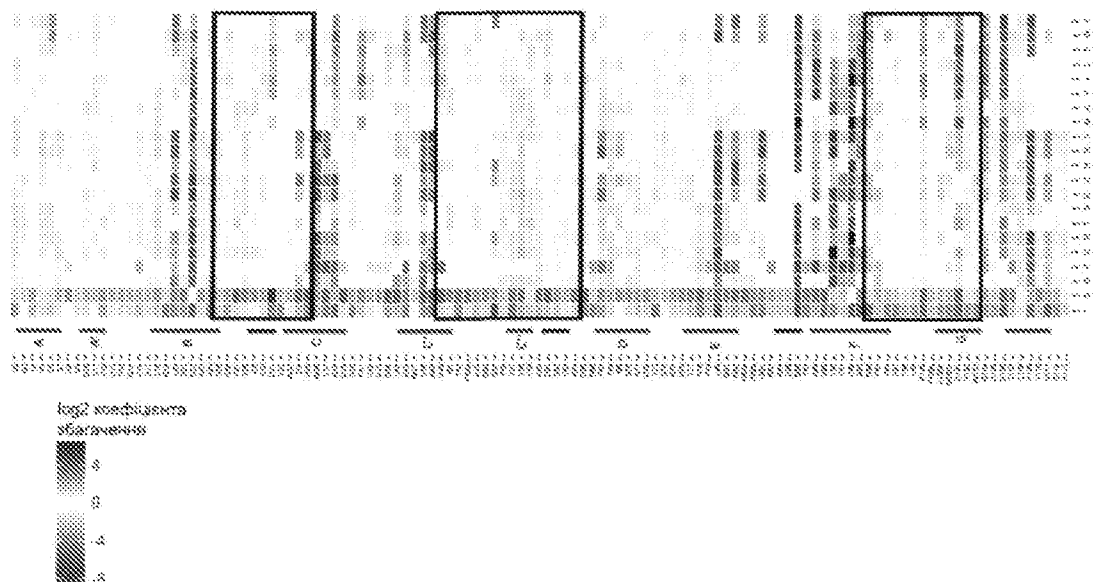
233. Застосування фармацевтичної композиції за п. 232 для лікування розладу, пов'язаного з патологічним ангиогенезом.

234. Застосування за п. 233, яке **відрізняється** тим, що розлад, пов'язаний з патологічним ангиогенезом, являє собою окулярний розлад або клітинний проліферативний розлад.

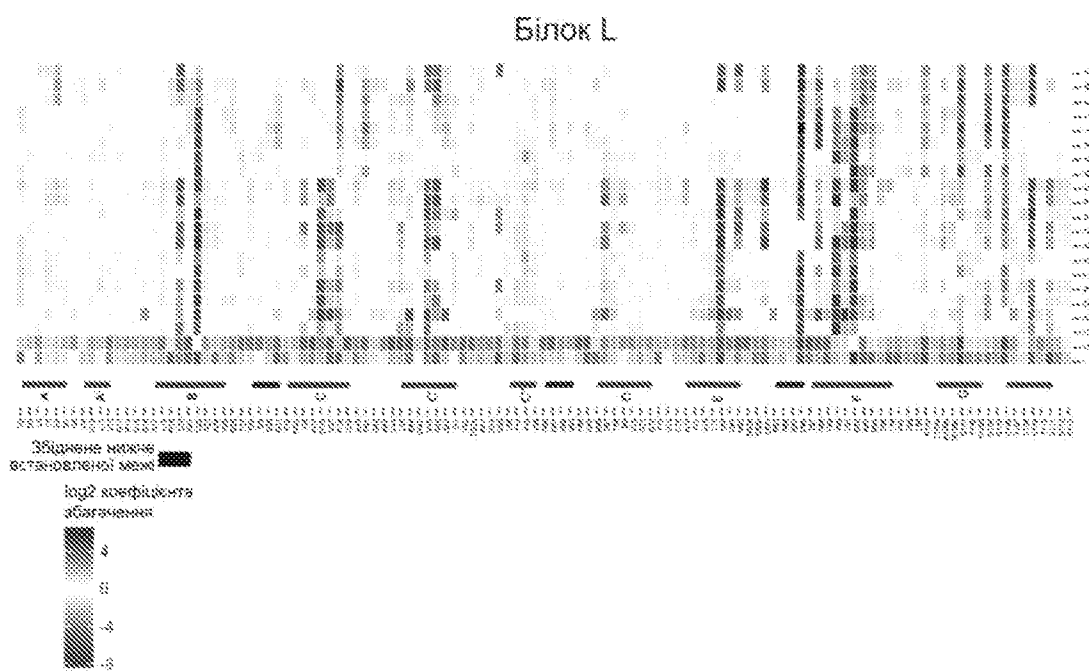
235. Застосування за п. 233, яке **відрізняється** тим, що окулярний розлад вибраний із групи, що складається з AMD, DME, DR або RVO.

Фіг. 1А

Анти-gD



Фіг. 1В



Фіг. 1С

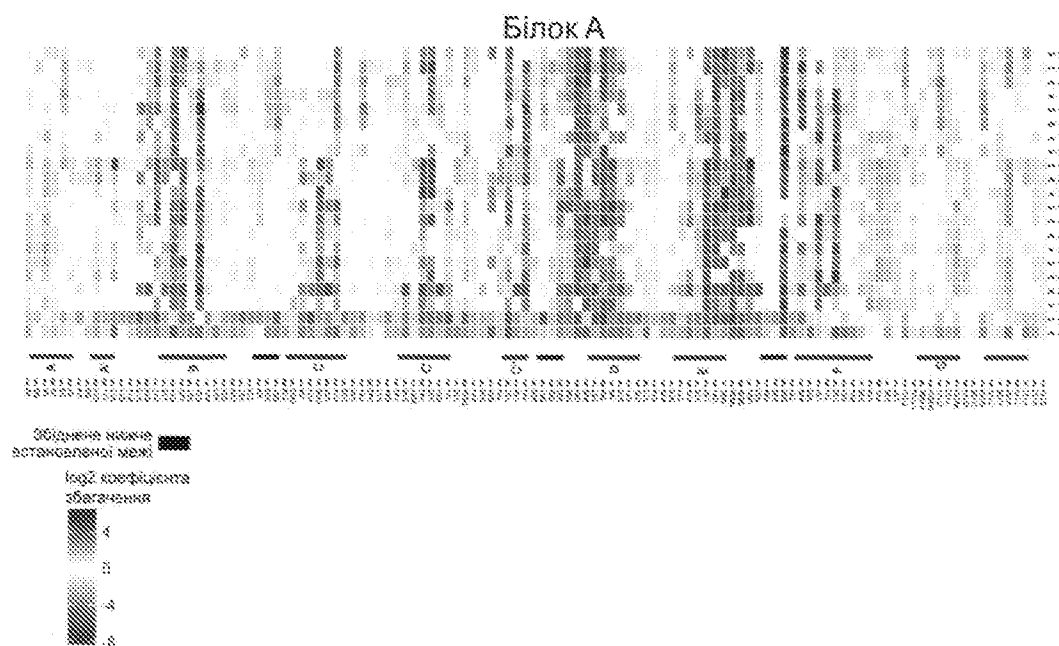


Fig. 1D

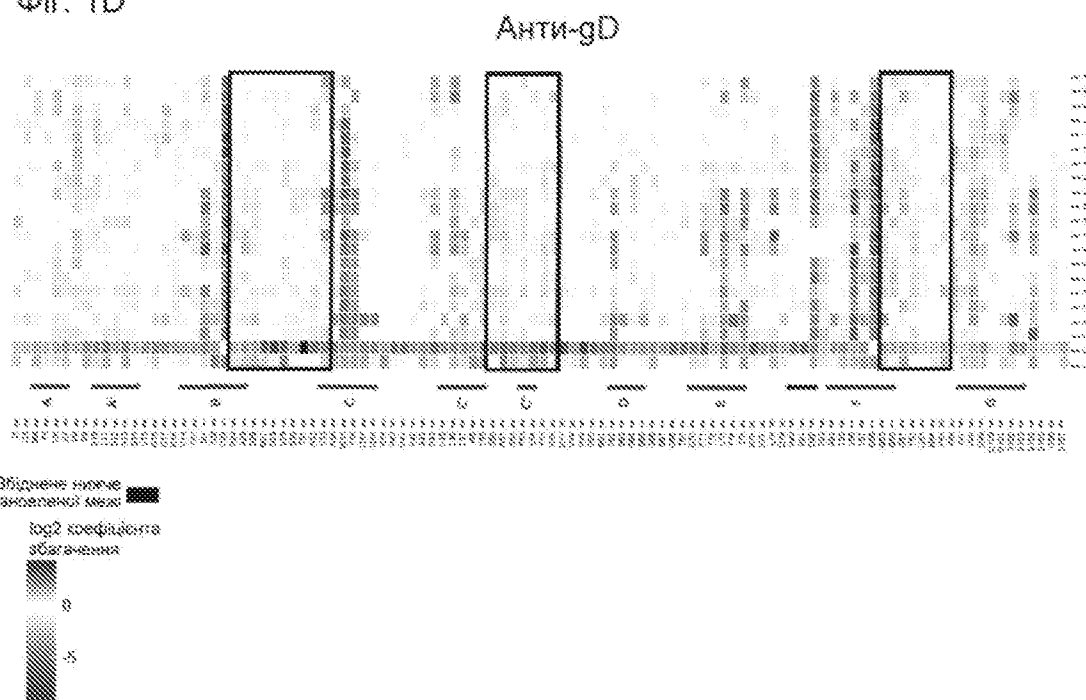
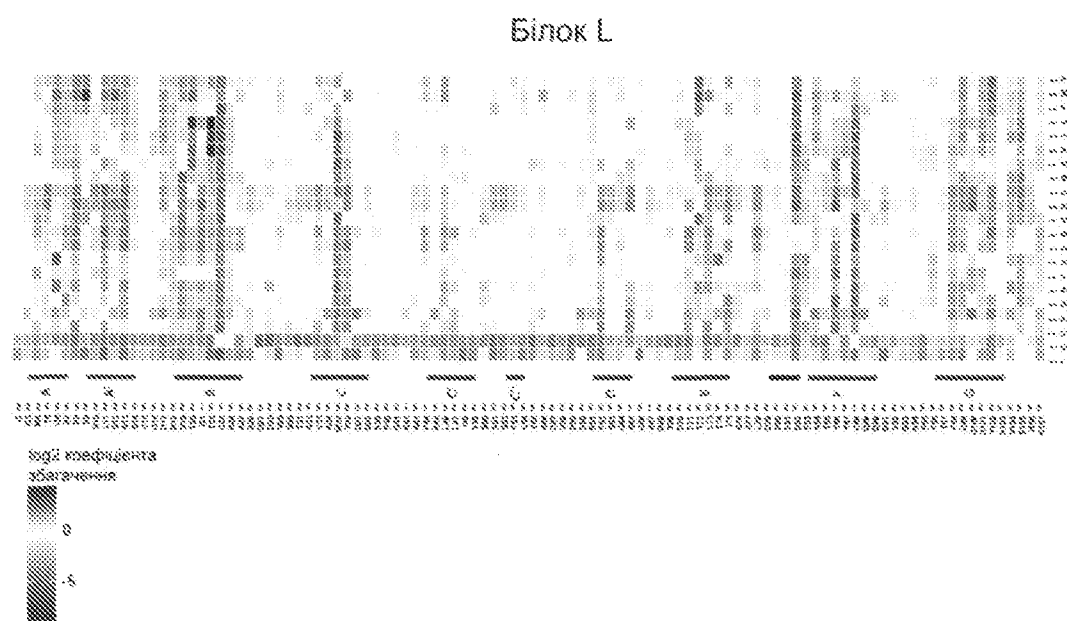
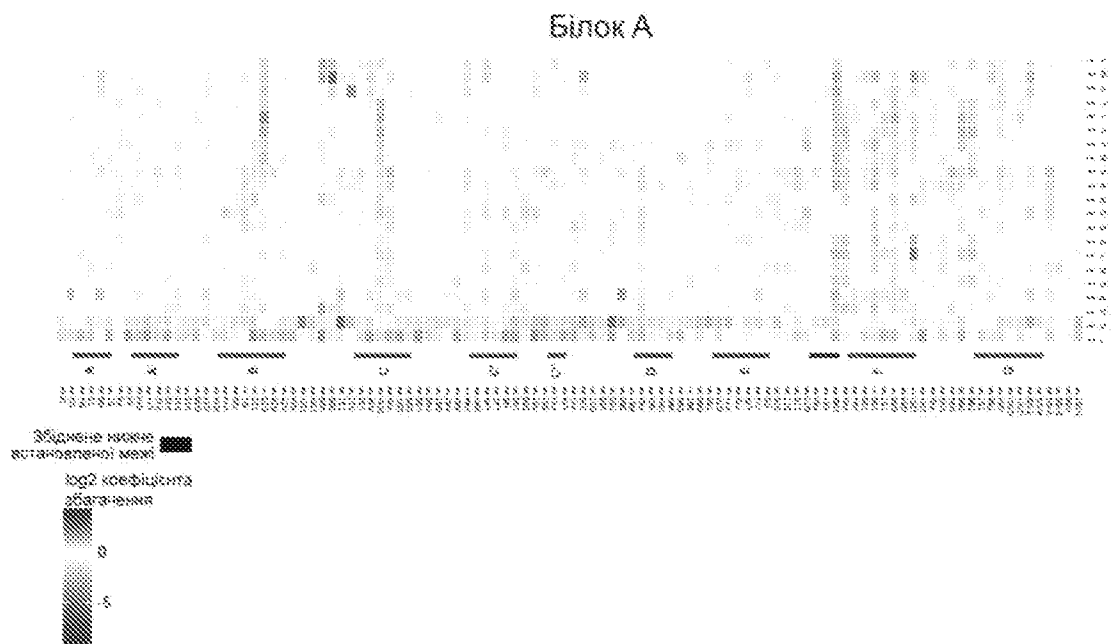


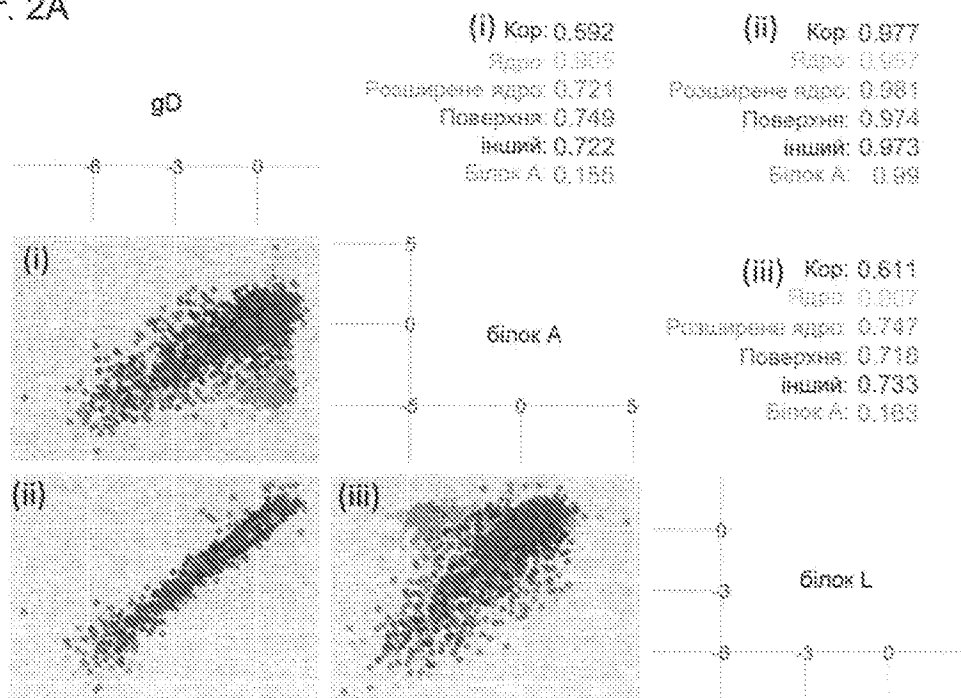
Fig. 1E



Dir. RF



Dir. 2A



11) Kap: 0,502

R² = 0.906

Recall score: 0.724

~~Nonexcess~~ 0.748

Intercept: 0.722

Box A Q. 188

(iii) Kop. 0.977

Page 657

Регистрация: 0.001

~~Nonstop: 0.0%~~~~Insert: 0.073~~

Box A: 0.00

(iii) $\text{K}_{\text{eq}} = 0.611$

Page: 0007

Penetration Angle: 0.747

~~Revised: 0.710~~

Intercept: 0.783

Box A: 0.983

Box A

Ginox L

Fig. 2B

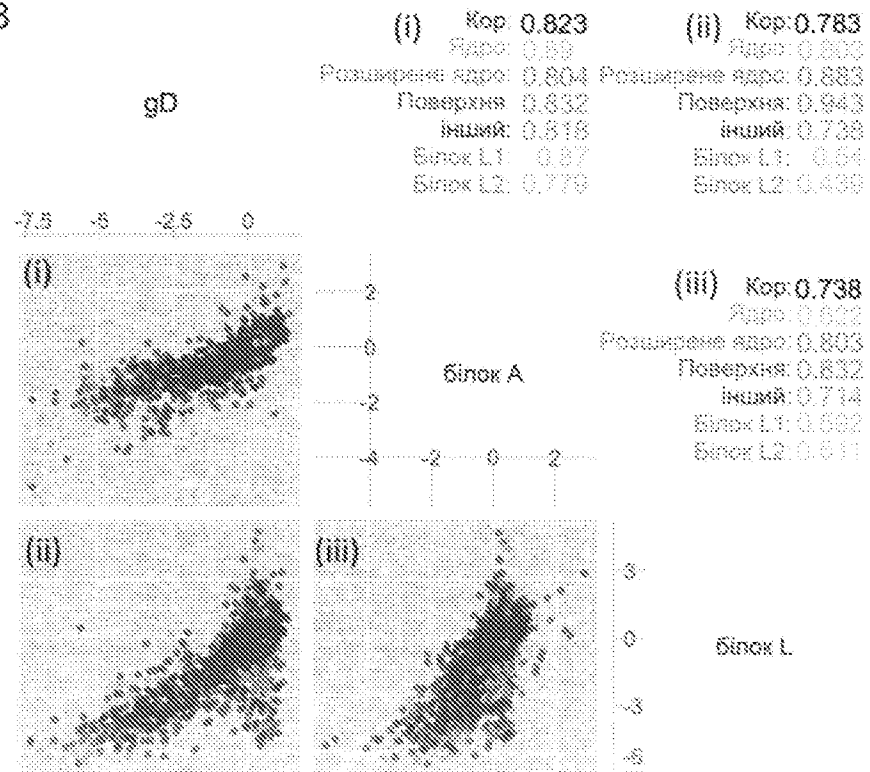


Fig. 3A

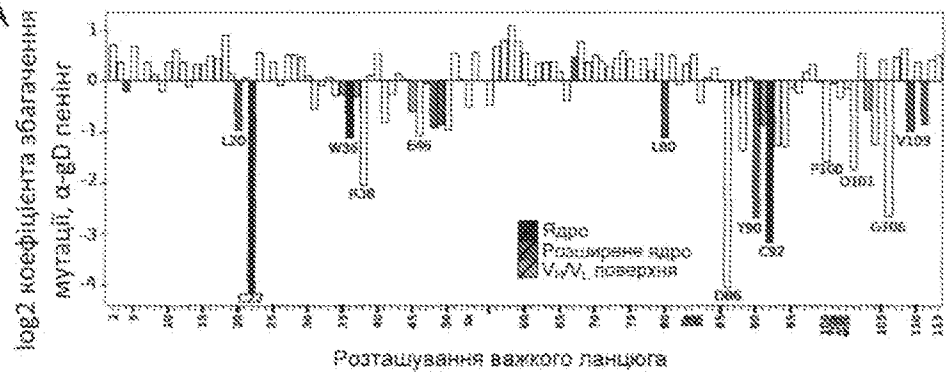
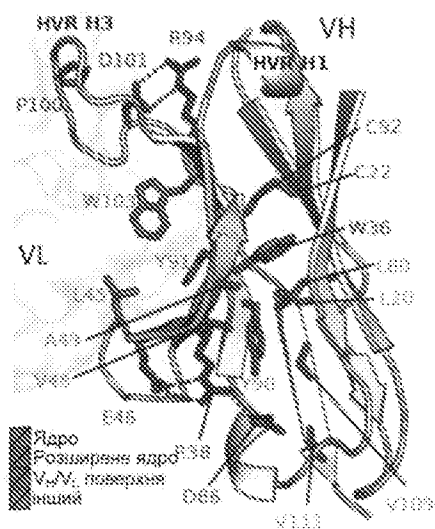


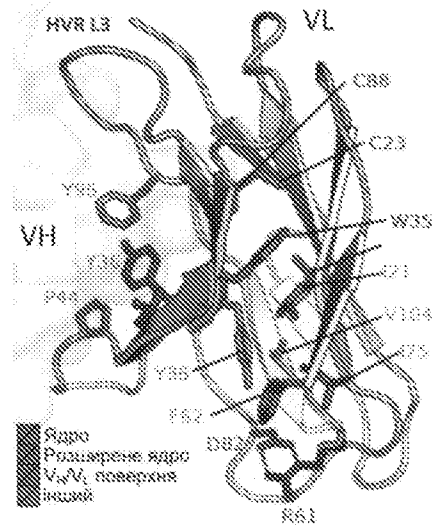
Fig. 3B



Фиг. 3С



Фиг. 3D



Фиг. 4А

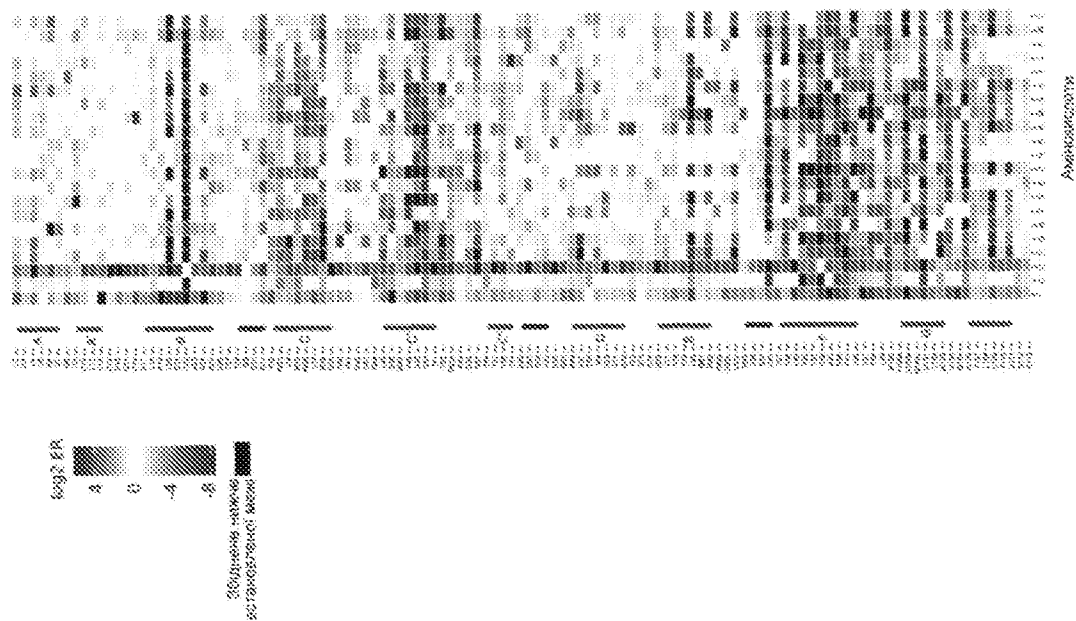


Fig. 4B

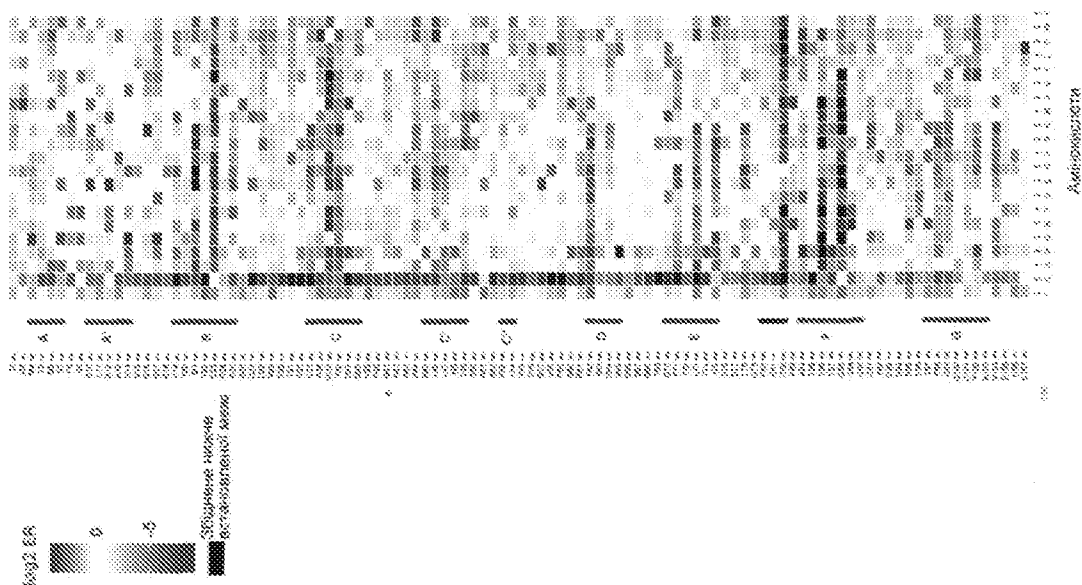


Fig. 5A

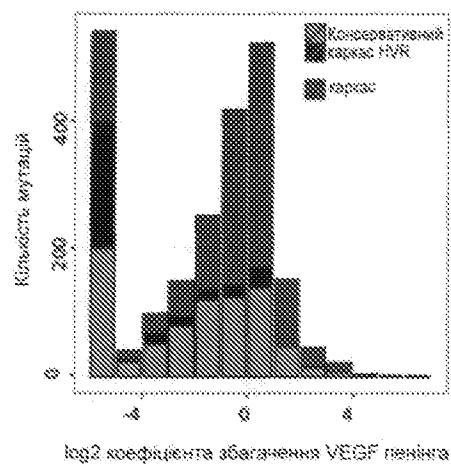
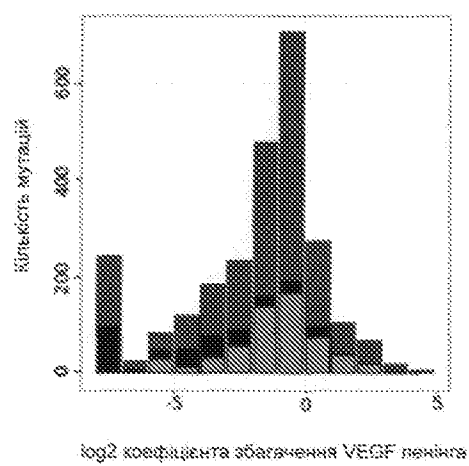
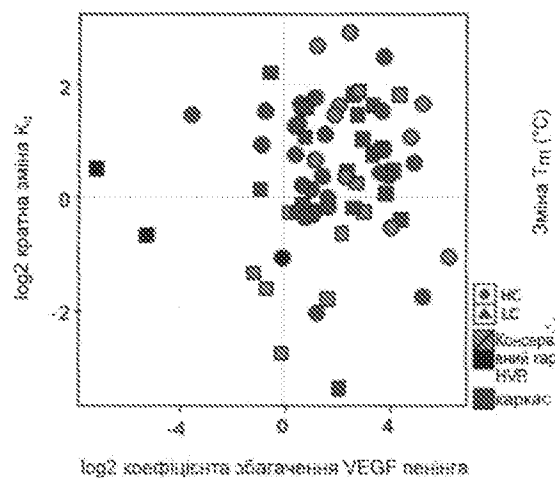


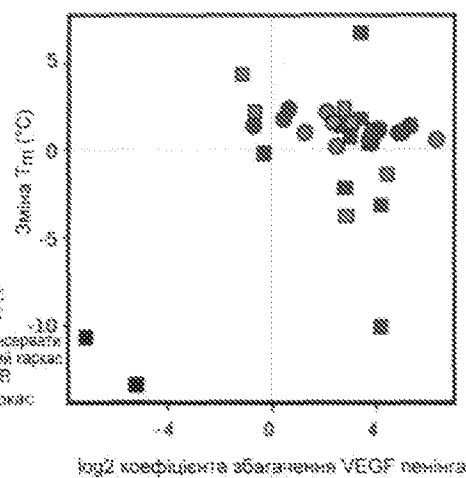
Fig. 5B



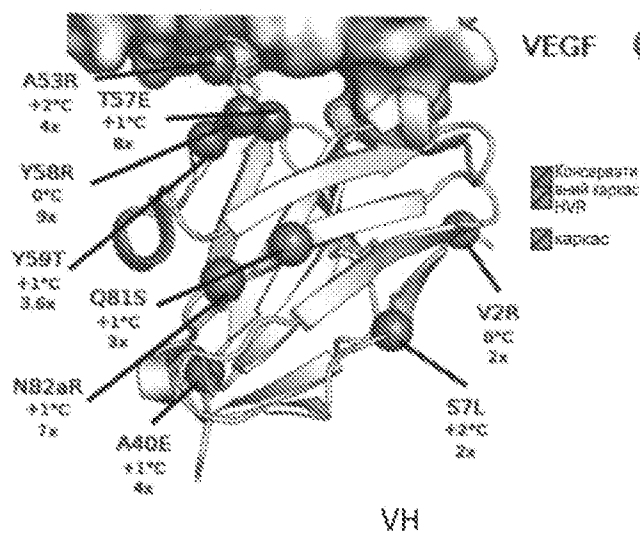
Фіг. 5C



Фіг. 5D



Фіг. 5E



Фіг. 5F

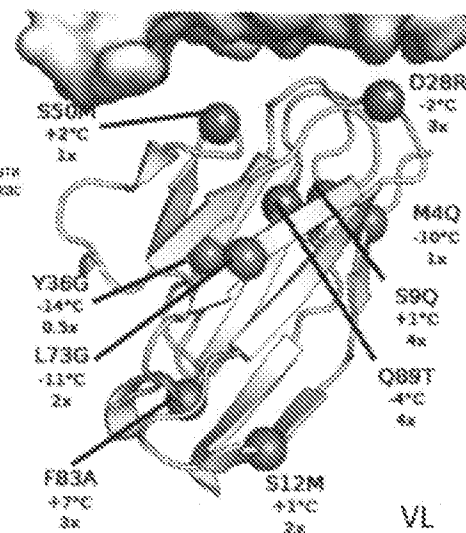


Fig. 6A

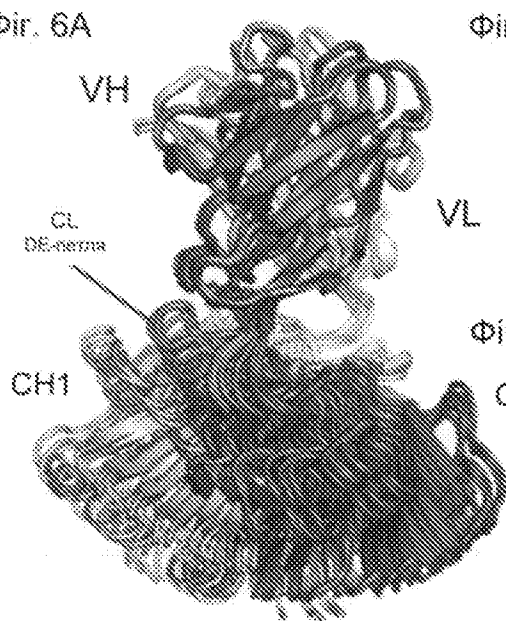


Fig. 6B

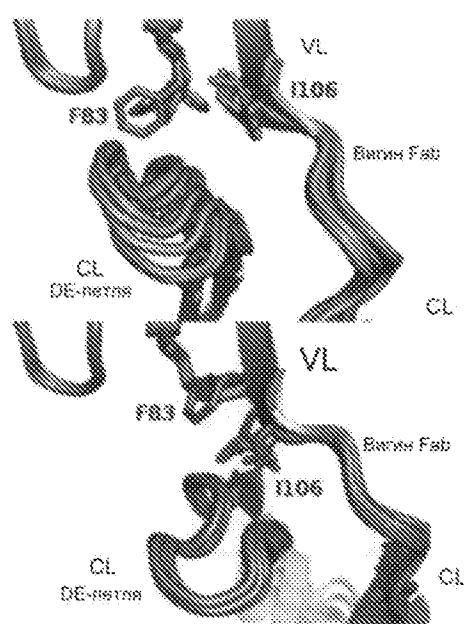


Fig. 6C

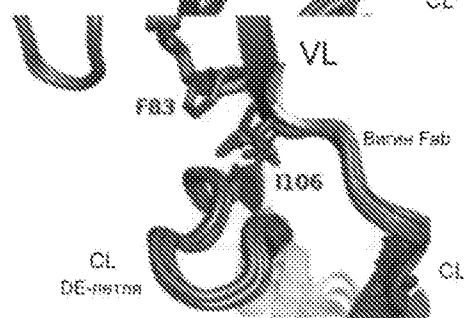


Fig. 7A

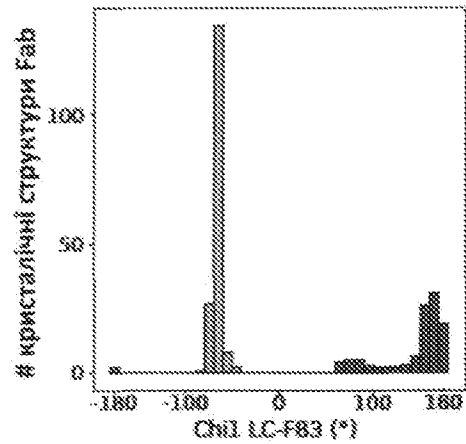
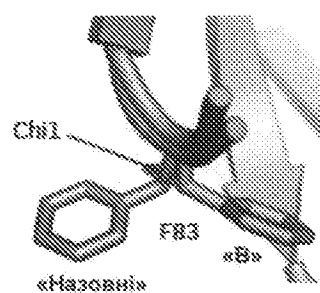


Fig. 7B

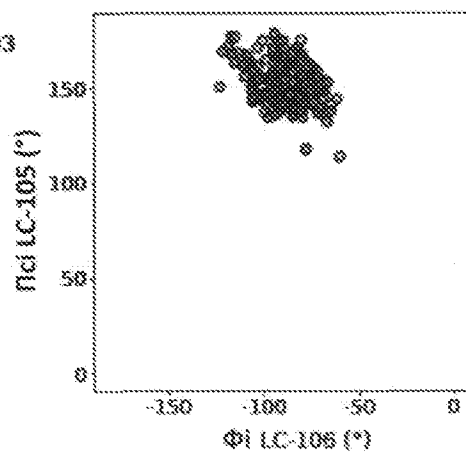
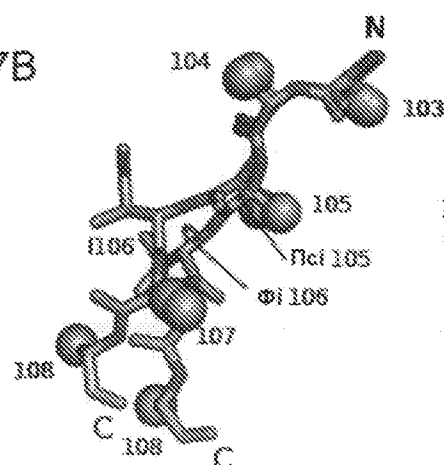


Fig. 7C

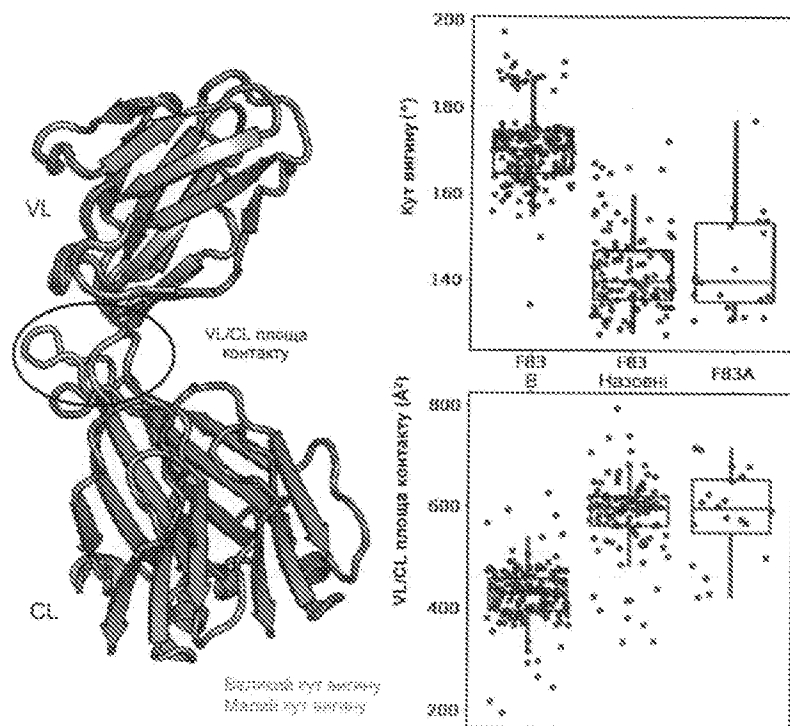
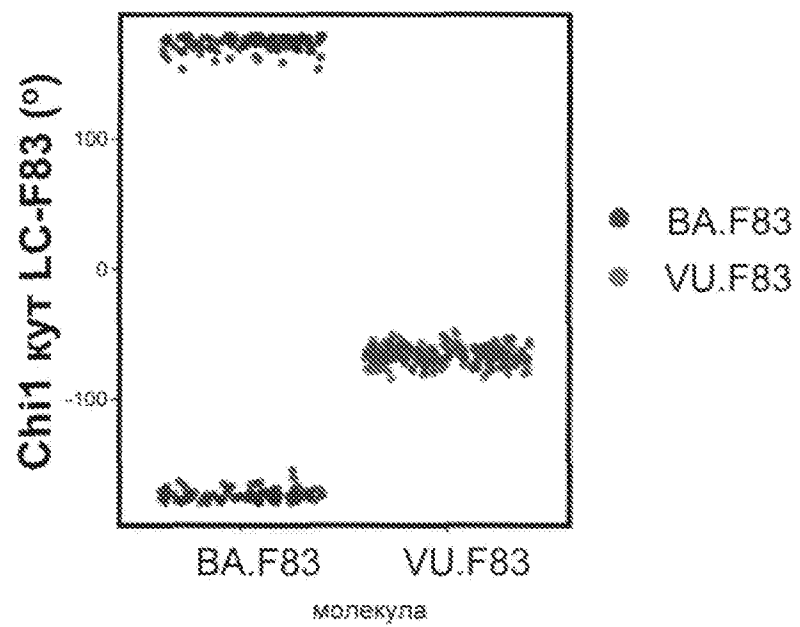
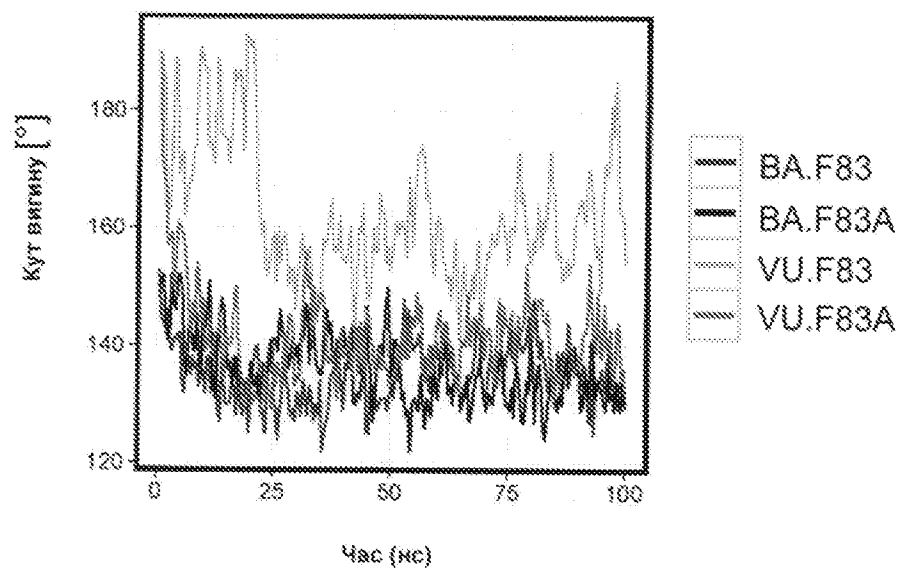


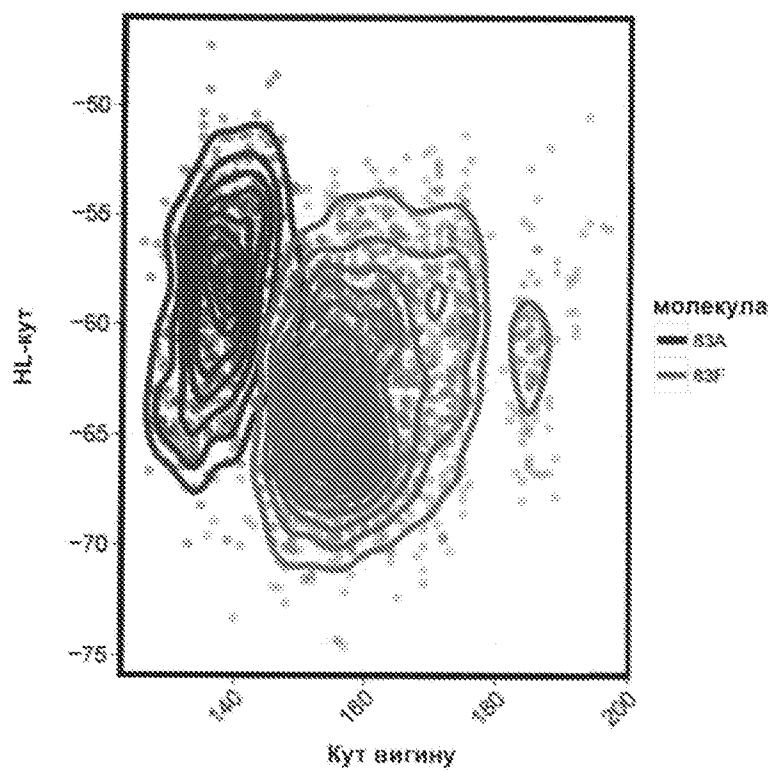
Fig. 8A



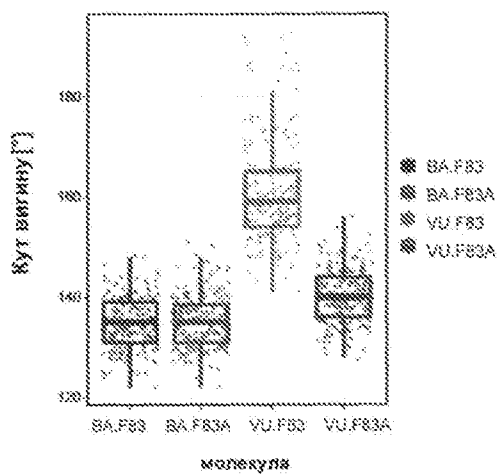
Фиг. 8В



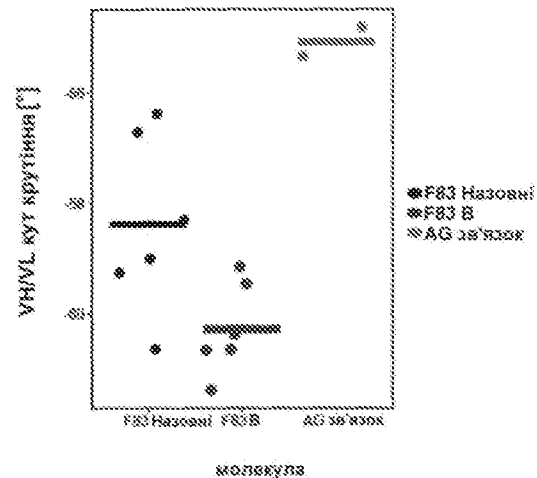
Фиг. 8С



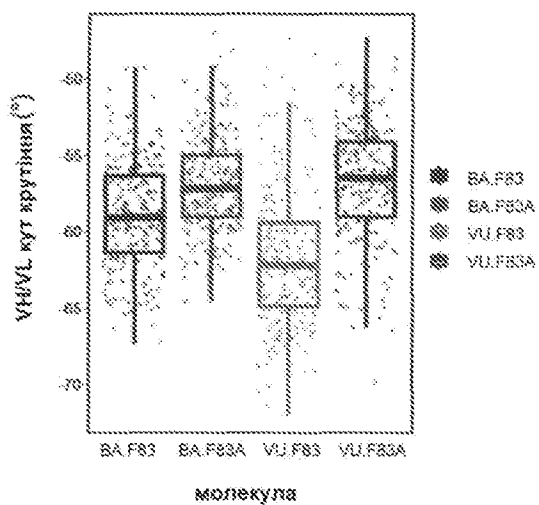
Фіг. 9А



Фіг. 9В



Фіг. 9С



Фіг. 9D

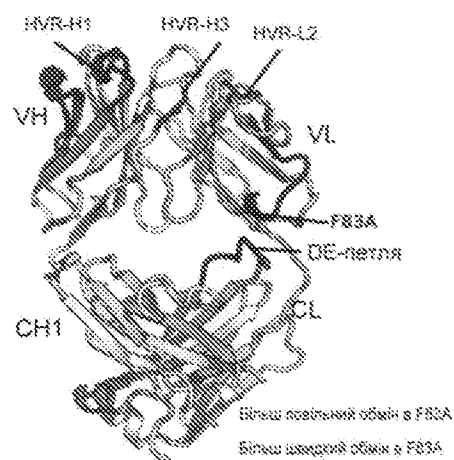


Fig. 10A

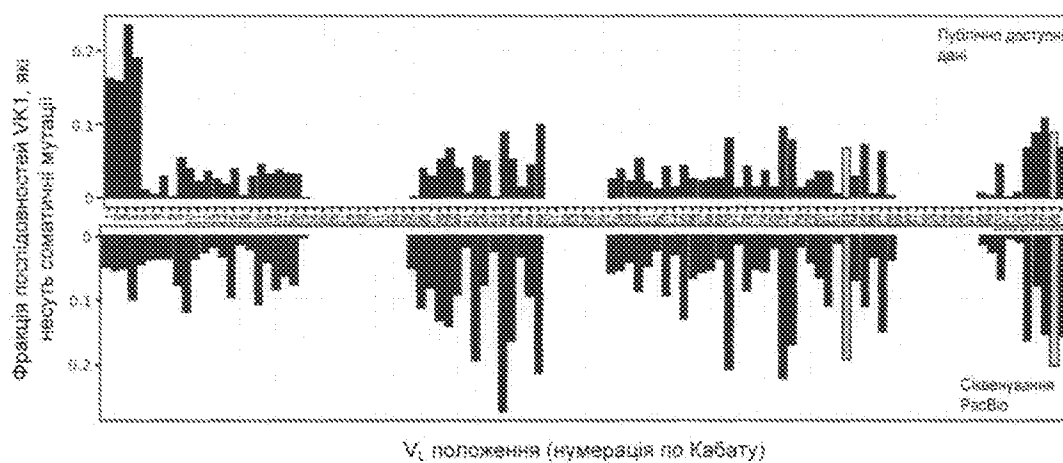


Fig. 10B

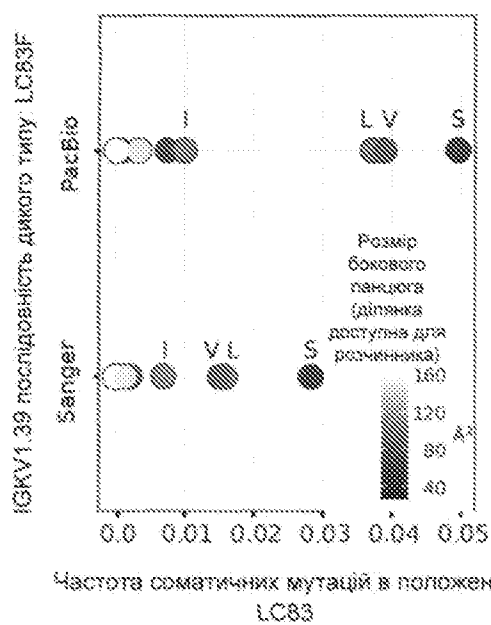
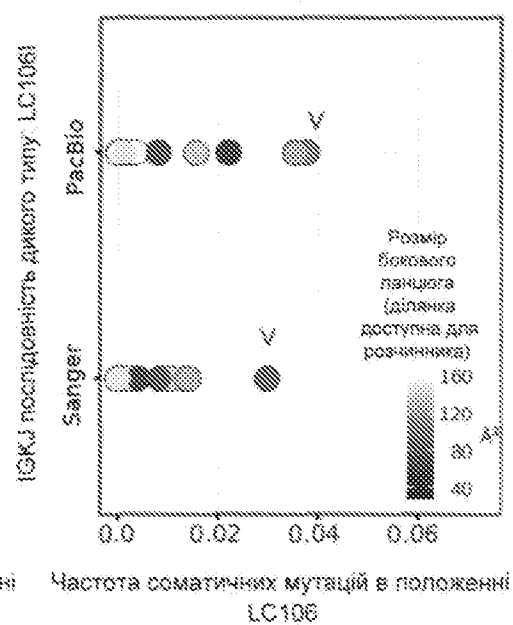
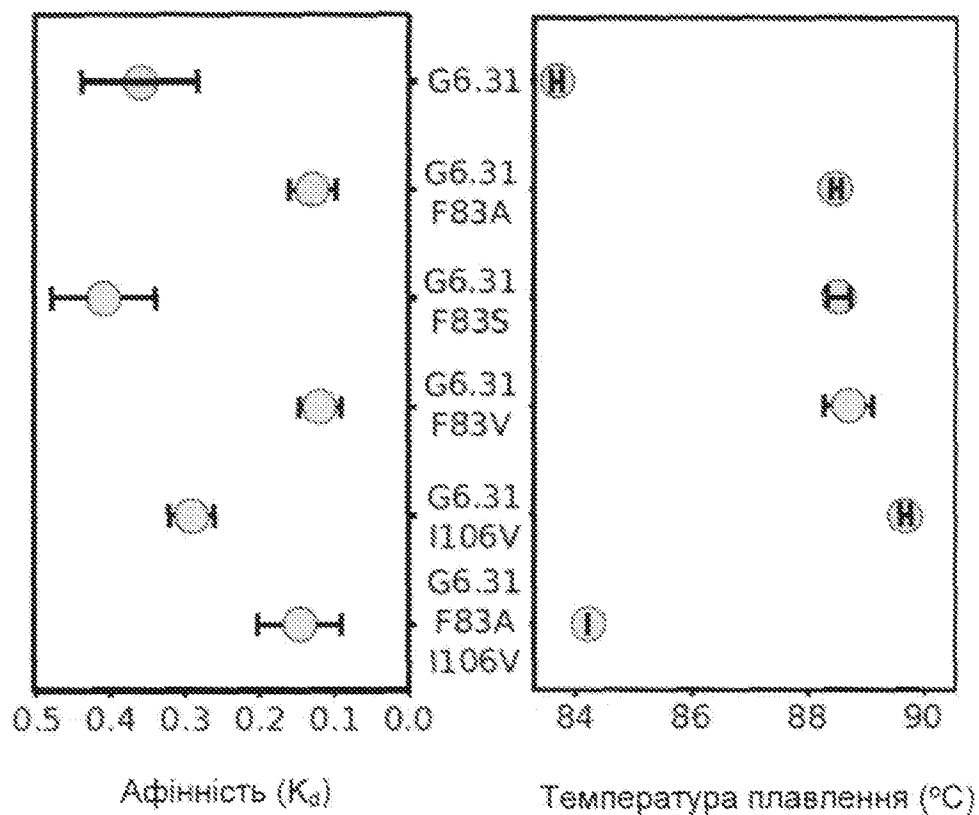


Fig. 10C



Фіг. 10D



Фіг. 11A

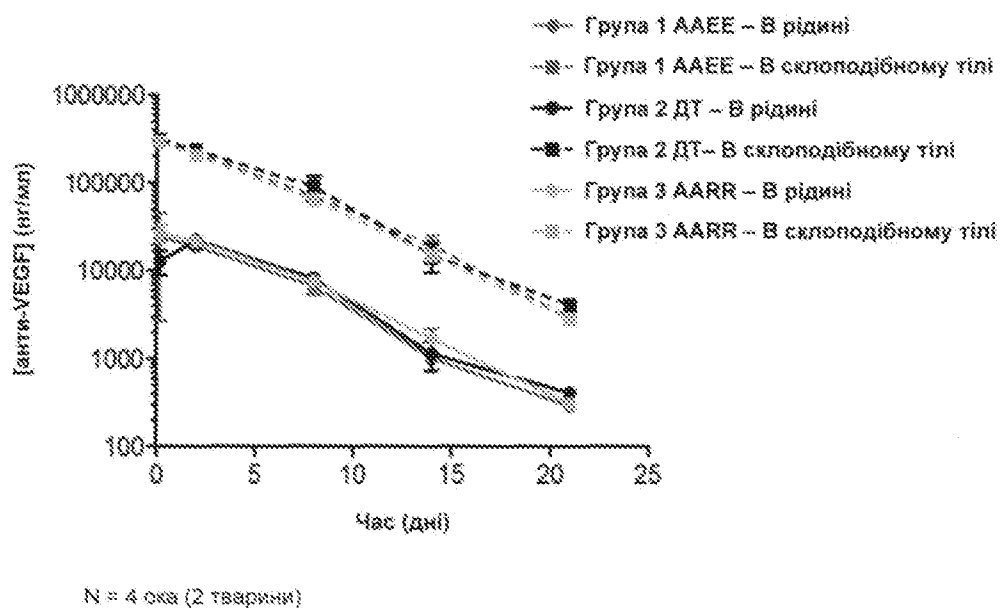
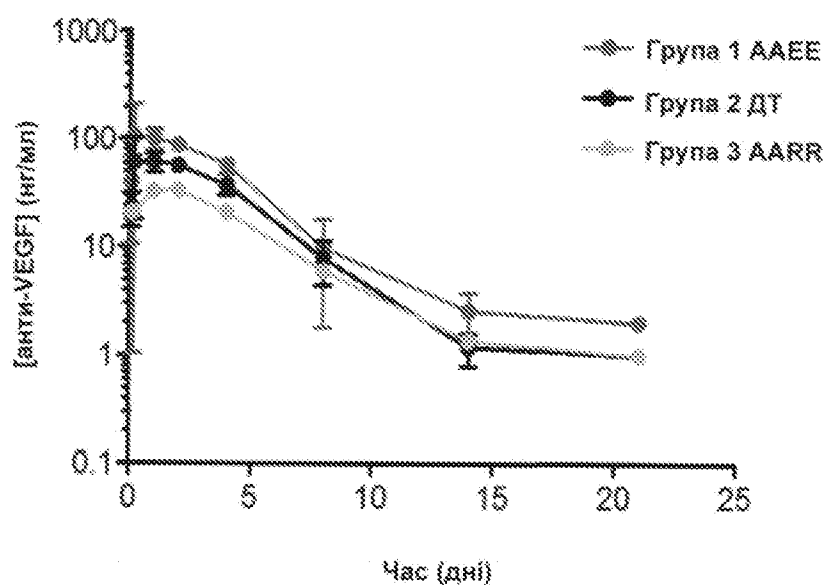


Fig. 11B



N = 4 тварини

Fig. 12

Назва	5 тижнів			8 тижнів			12 тижнів			24 тижнів		
	%НМД	%Апоптометр	%ВЛВ	%НМД	%Апоптометр	%ВЛВ	%НМД	%Апоптометр	%ВЛВ	%НМД	%Апоптометр	%ВЛВ
NCICS	1.11	97.42	1.46	5.88	93.36	0.76	11.18	91.95	6.88	18.08	80.25	1.67
N94A.F83A.Y58R.N82aR	0.89	97.62	1.45	3.53	95.37	1.18	8.65	89.69	2.26	14.25	83.81	1.93
N94A.F83A.A61C.T57E	1.34	95.91	1.75	3.66	94.06	2.29	6.73	87.80	3.46	14.91	83.55	2.44
N94A.F83A	1.43	95.81	1.16	3.64	91.35	1.01	8.67	86.65	4.49	14.00	82.26	3.74
NCIC2	3.29	91.73	4.39	5.13	90.90	3.69	9.19	84.91	5.50	16.68	81.70	3.33
N94A	1.05	97.17	1.78	4.84	91.79	1.52	10.53	97.99	1.88	10.08	81.58	2.34
Дітей тип G8.51	1.35	97.38	1.27	7.37	90.86	1.77	15.68	82.61	1.69	25.08	73.00	1.92
Рамбібузумаб	0.72	98.99	0.29	4.38	95.18	0.44	10.46	86.75	0.78	17.99	81.04	0.97

Fig. 13

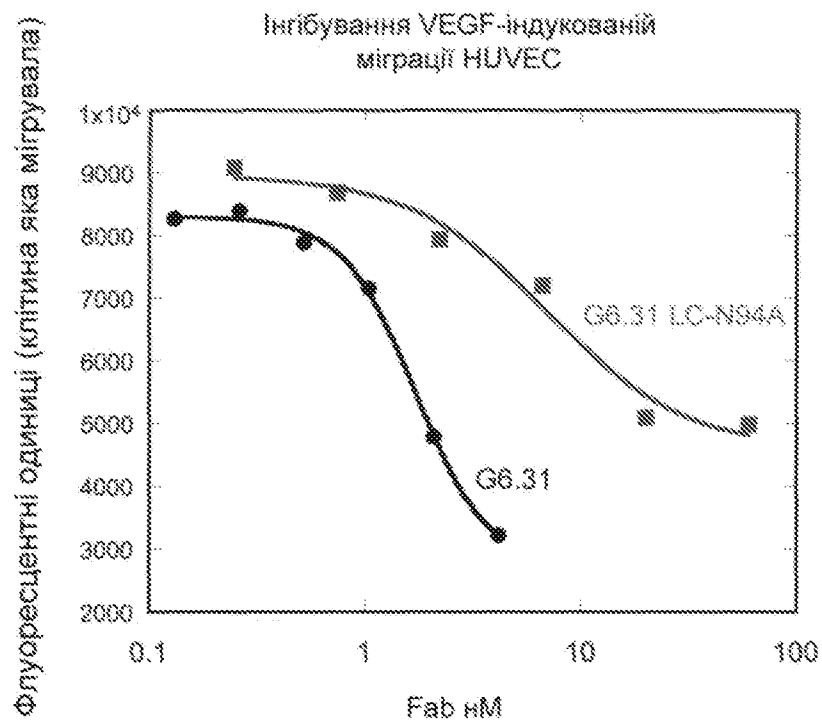
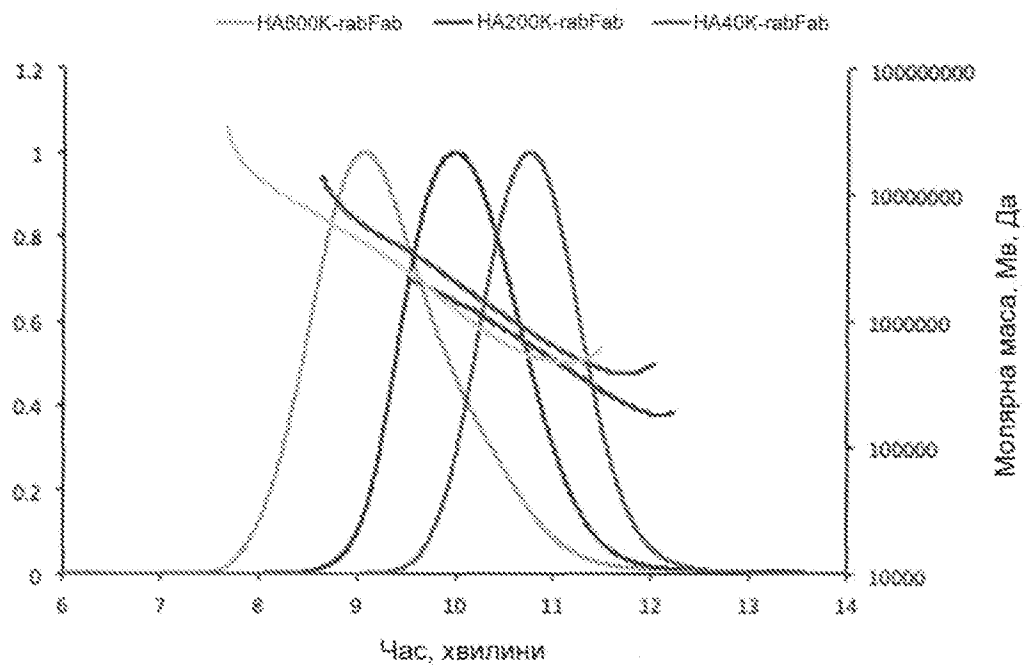
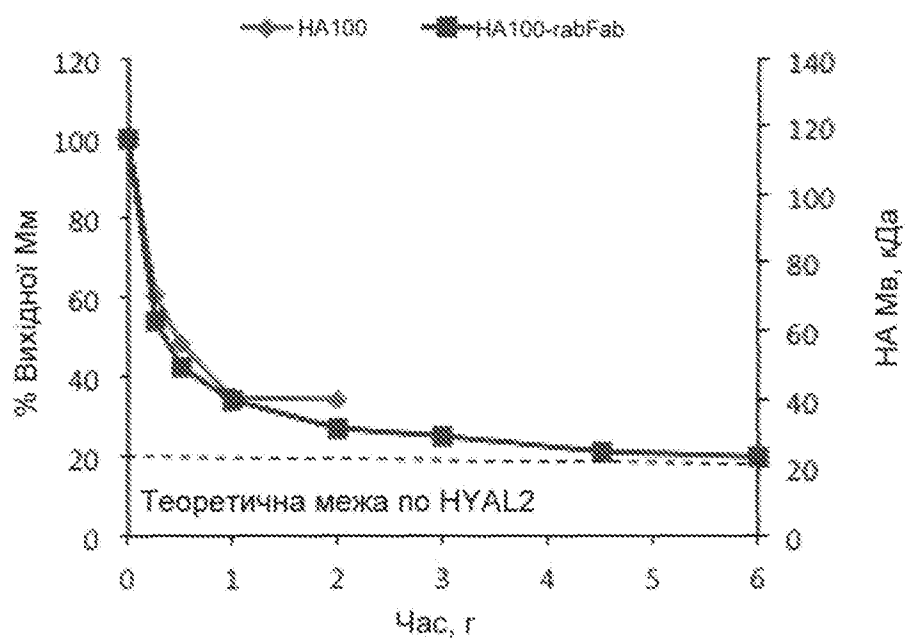


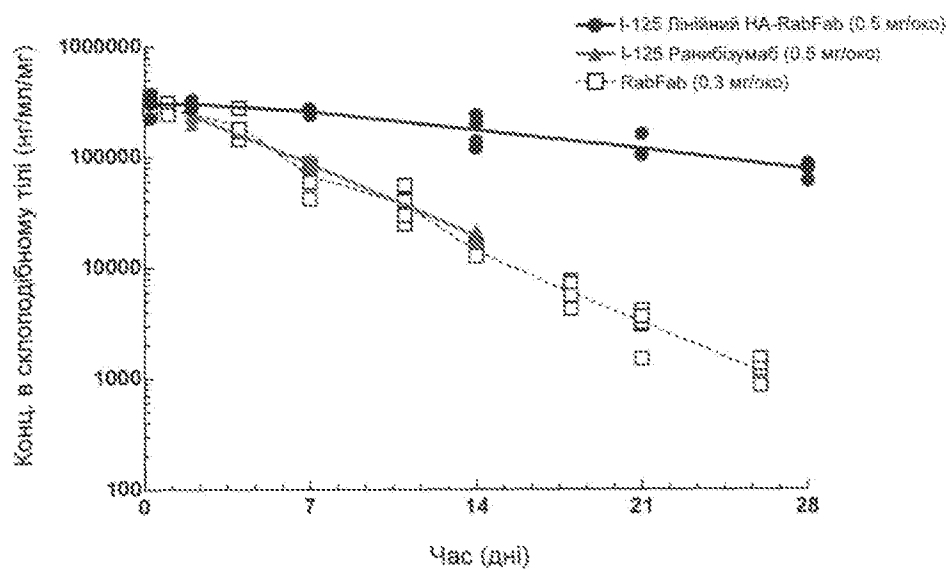
Fig. 14



Фіг. 15



Фіг. 16



Фіг. 17

