

Цей винахід стосується антитіл до VEGF-A/ANG2 та способів їх застосування.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ ВІНАХОДУ

Раніше повідомлялося про біспецифічні антитіла, які зв'язуються з VEGF і ANG2, і вони були запропоновані для терапії очних судинних захворювань, таких як вікова макулярна дегенерація. Фаріцімаб (MNH), повнорозмірне антитіло IgG1, що містить Fab-зв'язувальне плече, яке специфічно зв'язується з VEGF, і друге Fab-зв'язувальне плече, яке специфічно зв'язується з ANG2, є найсучаснішим біспецифічним терапевтичним засобом, який наразі оцінюється в клінічних дослідженнях III фази для лікування ДМО та нБМД (Sharma, A., Kumar, N., Kuppermann, B.D. et al. Eye 34, 802–804 (2020)).

В останні роки були запропоновані подальші комбіновані способи лікування, націлені на VEGF і ANG2 для лікування очних судинних захворювань (наприклад, WO2016/122996 A1, WO2018/037000A1, WO2019/200006A2, US 2020/0102381 A1).

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

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

Однак, існує потреба в покращених терапевтичних антитілах, які зв'язуються з VEGF і ANG2, наприклад, шляхом покращення ефективності порівняно зі стандартом лікування та шляхом покращення тривалості дії та, своєю чергою, зменшення частоти інтравітральних ін'єкцій, що призводить до меншого навантаження на пацієнта.

СУТНІСТЬ ВІНАХОДУ

Цей винахід стосується біспецифічних антитіл до VEGF-A/ANG2 і способів їх застосування.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить паратоп VEGF-A та паратоп ANG2 в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) та варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому паратоп VEGF-A містить амінокислотні залишки з CDR-H2, CDR-L1 та CDR-L3 антитіла, причому паратоп ANG2 містить амінокислотні залишки з CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2 антитіла.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить паратоп VEGF-A та паратоп ANG2 в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) та варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому пара варіабельного домену легкого ланцюга та варіабельного домену важкого ланцюга одночасно зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить паратоп VEGF-A та паратоп ANG2 в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) і варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому антитіло зв'язується з тим же епітопом на VEGF-A людини та з тим же епітопом на ANG2 людини, що й антитіло з варіабельним доменом важкого ланцюга SEQ ID NO:19 та варіабельним доменом легкого ланцюга SEQ ID NO:20.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF-A121 людини з K_D менш ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA, та (ii) з ANG2 людини з K_D менш ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, причому Fab-фрагмент антитіла демонструє температуру початку агрегації 70 °C або вище, що вимірюється за допомогою статичного розсіювання світла (SLS), в одному варіанті здійснення вимірю за допомогою SLS, як описано в главі "Термостабільність" у розділі "Матеріали та загальні методи".

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, причому Fab-фрагмент антитіла має температуру плавлення понад 80 °C, що вимірюється за допомогою статичного розсіювання світла (SLS), в одному варіанті здійснення вимірю за допомогою SLS, як описано в главі "Термічна стабільність" у розділі "Матеріали та загальні методи".

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, причому 20 мМ розчин His/HisHCl з pH 6,0, що містить 180 мг/мл Fab-фрагмента

антитіла, має в'язкість менше ніж 20 сП за 20 °С, виявлену за допомогою динамічного розсіювання світла за допомогою способу DLS латексних кульок, як описано в прикладі 8.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому амінокислотна послідовність SEQ ID NO:21 і (в) CDR-H3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить домен VH, який містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66, R94, D95, V96, F98 та F99, та домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y3, Y27, W27a, E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57, Y91, R92, Y93, H94 та P95, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом. В одному варіанті здійснення антитіло містить паратоп VEGF-A, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66 та D95, та наступні амінокислотні залишки в домені VL: I2, Y3, Y27, W27a, E32, R92, Y93, H94 та P95; та паратоп ANG2, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, R94, V96, F98 та F99, та наступні амінокислотні залишки в домені VL: E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57 та Y91.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19, причому домен VH містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, R66 та R94; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20, причому домен VL містить амінокислотні залишки I2, Y3, L46, F49 та E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен

VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19 з до 15 амінокислотних замін, причому амінокислотні заміни розташовані в положеннях 1, 2, 4-25, 28, 35d-54, 59, 60, 67-93, 97, 101-113 SEQ ID NO:19; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20 з до 15 амінокислотних замін, причому амінокислотні заміни розташовані в положеннях 1, 4-26, 27b-27d, 33-45, 47, 48, 51, 52, 58-90, 96-107 SEQ ID NO:20, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19 з до 15 амінокислотних замін; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20 з до 15 амінокислотних замін.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, і яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19 з до 15 амінокислотних замін; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20 з до 15 амінокислотних замін.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить послідовність VH SEQ ID NO:19 та послідовність VL SEQ ID NO:20.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:24 та амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:25.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF-A121 людини з K_D менше ніж 50 pM, що вимірюється за допомогою KinExA, та (ii) з ANG2 людини з K_D менш ніж 50 pM, що вимірюється за допомогою KinExA.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому антитіло містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з

амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:20; причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF-A121 людини з K_D менше ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA, та (ii) з ANG2 людини з K_D менш ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації 70 °C або більше.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому антитіло містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:20; причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації 70 °C або більше.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіювання світла.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому антитіло містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:20; а Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіювання світла.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, причому 20 мМ розчин His/HisHCl з pH 6,0, що містить 180 мг/мл Fab-фрагмента антитіла, має в'язкість менше ніж 20 сП за 20 °C, виявлену за допомогою динамічного розсіювання світла за допомогою способу DLS латексних кульок, як описано в прикладі 8.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, що містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну

послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому антитіло містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20; і причому 20 мМ розчин His/HisHCl з рН 6,0, що містить 180 мг/мл Fab-фрагмента антитіла, має в'язкість менше ніж 20 сП за 20 °С, виявлену за допомогою динамічного розсіювання світла за допомогою способу DLS латексних кульок, як описано в прикладі 8.

Один варіант здійснення цього винаходу стосується фрагмента антитіла, який зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини. Один варіант здійснення цього винаходу стосується фрагмента біспецифічного антитіла, який зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини. В одному варіанті здійснення фрагмент антитіла вибраний з Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ або одноланцюгових антитіл, одержаних з них. Один варіант здійснення цього винаходу стосується Fab-фрагмента, який зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини. Один варіант здійснення цього винаходу стосується Fv-фрагмента, який зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини.

Один варіант здійснення цього винаходу стосується повнорозмірного антитіла IgG, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано виділену нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло за цим винаходом.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано клітину-хазяїна, яка містить нуклеїнову кислоту за цим винаходом. В одному варіанті здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину CHO. В одному варіанті здійснення клітина являє собою клітину E. coli.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано експресійний вектор, який містить нуклеїнову кислоту за цим винаходом.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано спосіб одержання антитіла, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, який включає культивування клітини-хазяїна за цим винаходом так, щоб одержати антитіло.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, одержане способом за цим винаходом.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано фармацевтичний препарат, який містить антитіло за цим винаходом та фармацевтично прийнятний носій.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано попередньо заповнений шприц, який містить антитіло за цим винаходом та фармацевтично прийнятний носій.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано очний імплант, який містить антитіло за цим винаходом та фармацевтично прийнятний носій. В одному варіанті здійснення винахід включає порт-пристрій доставлення, що містить антитіло за винаходом.

В одному аспекті цього винаходу антитіло або фармацевтичний склад вводять за допомогою порт-пристрою доставлення.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло за цим винаходом для застосування як лікарського засобу, в одному варіанті здійснення для застосування в лікуванні судинного захворювання.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано застосування антитіла за цим винаходом або фармацевтичної композиції за цим винаходом у виготовленні лікарського засобу, в одному варіанті здійснення лікарського засобу для лікування судинного захворювання.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано спосіб лікування індивідууму, який має судинне захворювання, який включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла за цим винаходом або фармацевтичної композиції за цим винаходом.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано спосіб інгібування ангіогенезу у індивідууму, який включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла за цим винаходом або фармацевтичної композиції за цим винаходом для інгібування ангіогенезу.

Згідно з цим винаходом забезпечується терапевтичне антитіло до VEGF-A/ANG2, яке здатне зв'язуватися з його цільовими антигенами незалежно, навіть коли забезпечується у формі Fab-фрагмента антитіла. Антитіло за цим винаходом підходить для лікування судинних захворювань очей. Антитіло за винаходом забезпечує кілька цінних властивостей, які дозволяють його терапевтичне застосування, наприклад, високу спорідненість до обох мішеней, що підтримує низьку ефективну дозу,

і високу стабільність, вигідну протягом тривалого періоду. Порівняно з підходами без використання антитіл, антитіло за винаходом зазвичай є більш прийнятним через його високий рівень людських якостей і відсутність штучних доменів і лінкерів. Крім того, антитіло за винаходом може забезпечуватися в рідких складах з високими концентраціями з в'язкістю, придатною для застосування для очей. Оскільки лікування антитілом за винаходом можливе у високих концентраціях, воно є більш прийнятним для пацієнта, оскільки вищу дозу терапевтичного препарату можна застосувати під час одного лікування, що забезпечує більш тривалий цикл лікування. Крім того, під час використання як біспецифічного Fab-фрагмента для терапії антитіло за винаходом забезпечує більше сайтів зв'язування на дозу порівняно з біспецифічним повнорозмірним антитілом IgG.

СТИСЛИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фіг. 1. Схематичне зображення Fab-фрагмента антитіла до VEGF-A/ANG2 за цим винаходом. Показаний вид зверху вниз спорідненої пари VH/VL, який включає розташування амінокислоти CDR (верхнє зображення). Домен VH показаний сірим, домен VL показаний білим. Крім того, вказаним є просторове розташування ділянок CDR. Ділянки паратопу антитіла за цим винаходом виділені (нижнє зображення), причому паратоп VEGF-A розташований в ділянках H-CDR2, L-CDR1 та L-CDR2, а паратоп ANG2 розташований в ділянках H-CDR1, H-CDR3 та L-CDR2.

Фіг. 2. Амінокислотні послідовності доменів VH типових антитіл до VEGF-A/ANG2 за цим винаходом. Вказана нумерація за Кабатом положення амінокислот, а також ділянок CDR та FR. Виділені положення амінокислот, які роблять внесок у паратоп VEGF-A, а також паратоп ANG2, як визначено у прикладі 13.

Фіг. 3. Амінокислотні послідовності доменів VL типових антитіл до VEGF-A/ANG2 за цим винаходом. Вказана нумерація за Кабатом положення амінокислот, а також ділянок CDR та FR. Виділені положення амінокислот, які роблять внесок у паратоп VEGF-A, а також паратоп ANG2, як визначено у прикладі 13.

Фіг. 4. Незалежне зв'язування біспецифічного антитіла P1AD9820 з VEGF-A та ANG2, оцінене за допомогою ППР відповідно до прикладу 5.

Фіг. 5. Блокувальна активність VEGF-A121 і VEGF-A165 зазначених антитіл, визначена у прикладі 11.

Фіг. 6. Блокувальна активність VEGF-A121 і VEGF-A165 зазначених антитіл за винаходом і аналогів антитіл за попереднім рівнем техніки, визначена у прикладі 11.

Фіг. 7. Аналіз гена-репортера (RGA) для аналізу інгібування VEGF-A вказаними антитілами за винаходом і аналогом антитіл за попереднім рівнем техніки, визначених у прикладі 10.

Фіг. 8. Аналіз pTie2 для аналізу інгібування ANG2 зазначеними антитілами за винаходом і аналогом антитіла за попереднім рівнем техніки, визначених у прикладі 10.

Фіг. 9. Інгібування ANG1, опосередковане P1AD9820, визначене в прикладі 12.

Фіг. 10. В'язкість, виміряна способом DLS латексних кульок, Fab-фрагментів P1AA0902 (зверху ліворуч) і P1AD9820 (зверху праворуч), отриманих в E.coli, і P1AD9820, отриманих в CHO (посередині), визначена в прикладі 8.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

1. Визначення

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

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

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

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

"Виділене" антитіло являє собою антитіло, яке було відокремлено від компонентів його природного оточення. У деяких варіантах здійснення антитіло є очищеним до більш ніж 95 % або 99 % чистоти, яка визначається, наприклад, за допомогою електрофорезу (наприклад, ДСН-ПААГ-електрофореуз, ізоелектричного фокусування (ІЕФ), капілярного електрофорезу) або способу хроматографії (наприклад, іонообмінної або обернено-фазової ВЕРХ). Огляд способів оцінки чистоти антитіл див.,

наприклад, у Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

Термін "моноклональне антитіло", як використовується в цьому документі, стосується антитіла, одержаного з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, які складають популяцію, є ідентичними та/або зв'язують один і той самий епітоп, за винятком можливих варіантних антитіл, які, наприклад, містять природні мутації або виникають під час отримання препарату моноклональних антитіл, причому такі варіанти в цілому є присутніми в незначних кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які зазвичай містять різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло препарату моноклональних антитіл спрямоване проти однієї детермінанти на антигені. Таким чином, модифікатор "моноклональний" вказує на характер антитіла, як одержаного з головним чином гомогенної популяції антитіл, і його не варто сприймати як такий, що вимагає одержання антитіла будь-яким конкретним методом.

Терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" та "цільне антитіло" вживають у цьому документі взаємозамінно для позначення антитіла, яке має структуру, по суті схожу з нативною структурою антитіла, або яке має важкі ланцюги, що містять Fc-ділянку за визначенням у цьому документі.

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

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

Термін "варіабельна ділянка" або "варіабельний домен" стосується домену важкого або легкого ланцюга антитіла, який бере участь у зв'язуванні антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга та легкого ланцюга (VH та VL, відповідно) нативного антитіла зазвичай мають схожі структури, причому кожен домен містить чотири консервативні каркасні ділянки (FR) і три гіперваріабельні ділянки (HVR) (див., наприклад, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)). В антитілі за цим винаходом одна пара домену VH та домену VL, тобто споріднена пара VH/VL, специфічно зв'язується з двома його мішенями: VEGF-A та ANG2.

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

"Людське антитіло" являє собою антитіло, яке містить амінокислотну послідовність, що відповідає послідовності антитіла, яке продукує організм людини або клітина людини або є одержаним із відмінного від людського джерела, в якому використані репертуари людських антитіл або інші послідовності, що кодують людські антитіла. Це визначення людського антитіла явним чином виключає гуманізоване антитіло, яке містить антигензв'язувальні залишки відмінного від людини виду. Антитіла або фрагменти антитіл, виділені з бібліотек людських антитіл, вважають в цьому документі людськими антитілами або фрагментами людських антитіл.

"Людська консенсусна каркасна ділянка" являє собою каркасну ділянку, яка представляє амінокислотні залишки, що найчастіше зустрічаються, в наборі каркасних послідовностей VL або VH людського імуноглобуліну. Зазвичай набір послідовностей VL або VH людського імуноглобуліну отримано із підгрупи послідовностей варіабельних доменів. В загальному випадку підгрупа послідовностей являє собою підгрупу згідно з Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), т. 1-3. В одному варіанті здійснення для VL підгрупа являє собою підгрупу каппа I за Кабатом та співавт., вище. В одному варіанті

здійснення для VH підгрупа являє собою підгрупу III за Кабатом та співавт., вище.

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

"Паратоп" або "антигензв'язувальний сайт", що використовуються взаємозамінно у цьому документі, стосуються частини антитіла, яка розпізнає і зв'язується з антигеном. Паратоп утворений декількома окремими амінокислотними залишками з варіабельних доменів важкого та легкого ланцюга антитіла, розташованих у просторовій близькості у третинній структурі Fv-ділянки. Антитіла за цим винаходом містять два паратопа в одній спорідненій парі VH/VL.

Використовуваний у цьому документі "паратоп VEGF-A" є паратопом або сайтом зв'язування антигену, який зв'язується з VEGF-A. Паратоп VEGF-A антитіла за винаходом містить амінокислотні залишки CDR-H2, CDR-L1 і CDR-L3 антитіла.

Використовуваний у цьому документі "паратоп ANG2" являє собою паратоп або антигензв'язувальний сайт, який зв'язується з ANG2. Паратоп ANG2 антитіла за цим винаходом містить амінокислотні залишки CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2 антитіла.

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

Терміни "антитіло до VEGF-A" та "антитіло, яке зв'язується з VEGF-A" стосуються антитіла, яке здатне зв'язувати VEGF-A з достатньою спорідненістю, щоб антитіло було корисним як діагностичний та/або терапевтичний засіб у націленні на VEGF-A. В одному варіанті здійснення ступінь зв'язування антитіла до VEGF-A з неспорідненим білком, не пов'язаним з VEGF-A, становить менше приблизно 10 % від зв'язування антитіла з VEGF-A, виміряного, наприклад, поверхневим плазмонним резонансом (ППР). У деяких варіантах здійснення антитіло, яке зв'язується з VEGF-A, має константу дисоціації (K_D) ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ або $\leq 0,01$ нМ. Антитіло, як говорять, "специфічно зв'язується" з VEGF-A, коли антитіло має K_D 1 мкМ або менше.

Використовуваний у цьому документі термін "ангіопетин-2", скорочений як "ANG2", стосується будь-якого нативного ANG2 з будь-якого джерела, що належить до хребетних, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, люди) і гризуни (наприклад, миші та щури), якщо не зазначено інше. Цей термін охоплює "повнорозмірний" непроцесований ANG2, а також будь-яку форму ANG2, утворювану в результаті процесингу в клітині. Цей термін також включає варіанти ANG2, що зустрічаються в природі, наприклад, сплайс-варіанти або алельні варіанти. Амінокислотна послідовність типового ANG2 людини зображена в SEQ ID NO:27.

Терміни "антитіло до ANG2" і "антитіло, яке зв'язується з ANG2" стосуються антитіла, яке здатне зв'язувати ANG2 з достатньою афінністю, так щоб антитіло можна було застосовувати як діагностичний та/або терапевтичний засіб для націлювання на ANG2. В одному варіанті здійснення ступінь зв'язування антитіла до ANG2 з неспорідненим, який не є ANG2, білком становить менше ніж приблизно 10 % від зв'язування антитіла з ANG2, що вимірюється, наприклад, за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР). У деяких варіантах здійснення антитіло, яке зв'язується з ANG2, має константу дисоціації (K_D) ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ або $\leq 0,03$ нМ. Антитіло, як говорять, "специфічно зв'язується" з ANG2, коли антитіло має K_D 1 мкМ або менше.

Антитіло за цим винаходом "одночасно зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини", що означає, що (а) Fab-фрагмент антитіла за цим винаходом, який зв'язується з ANG2 людини, (також) специфічно зв'язується з VEGF-A людини, а (б) Fab-фрагмент антитіла за цим винаходом, який зв'язується з VEGF-A людини, (також) специфічно зв'язується з ANG2 людини. Одночасне зв'язування можна оцінити за допомогою способів, відомих в цій галузі техніки, наприклад, за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, як описано в цьому документі.

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

"Каркасні ділянки" або "FR" при використанні в цьому документі стосуються амінокислотних

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

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

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

* в CDR-H1 можуть бути присутні додаткові амінокислоти між положенням 35b та 36, в цьому документі вони називаються положеннями "35c", "35d" та "35e", як показано на фігурах 2 та 3

Положення амінокислот згідно з системою нумерації за Кабатом, які згадуються в цьому документі, показані на фігурах 2 та 3 відповідно до амінокислотних послідовностей антитіл за цим винаходом. Посилання на амінокислоти в певному положенні в амінокислотній послідовності в цьому документі зроблені, як добре відомо в цій галузі техніки, шляхом вказування відповідної амінокислоти та положення амінокислоти, наприклад, "E2" стосується залишку глутамінової кислоти, розташованої в положенні 2 за Кабатом амінокислотної послідовності відповідного домену антитіла.

"Афінність" стосується сили суми всіх нековалентних взаємодій між одиничним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитіла) і її партнера по зв'язуванню (наприклад, антигену). Якщо не вказано інше, в цьому документі термін "афінність зв'язування" стосується властивості молекули афінності зв'язування, що відображає взаємодію між членами пари зв'язування (наприклад, антитілом і антигеном) за їх співвідношення 1:1. Афінність молекули X щодо її партнера Y зазвичай можна представити константою дисоціації (K_D). Афінність можна вимірювати за допомогою загальноприйнятих способів, відомих у цій галузі техніки, включаючи описані в цьому документі. Конкретні ілюстративні та типові варіанти здійснення для вимірювання афінності зв'язування описані в цьому документі.

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

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

Засноване на структурі антигену профілювання антитіл (ASAP), також відоме як профілювання за допомогою модифікації (MAP), забезпечує збереження множини моноклональних антитіл, які специфічно зв'язуються з VEGF-A або ANG2, на основі профілю зв'язування кожного з антитіл з множини з хімічно або ферментативно модифікованими поверхнями антигену (див., наприклад, US 2004/0101920). Антитіла в кожній групі зв'язуються з одним і тим самим епітопом, який може бути унікальним епітопом або таким, що явно відрізняється, або таким, що частково перекривається, з епітопом, представленим іншою групою.

Також конкурентне зв'язування можна використовувати для легкого визначення того, чи зв'язується антитіло з одним і тим самим епітопом VEGF-A або ANG2, або конкурує відносно зв'язування з ним, що й еталонне антитіло за цим винаходом. Наприклад, "антитіло, яке зв'язується з тими ж епітопами на VEGF-A та ANG2", що й еталонне антитіло, стосується антитіла, яке блокує зв'язування еталонного антитіла з його антигенами у відповідному конкурентному аналізі на 50 % або більше, і, навпаки, еталонне антитіло блокує зв'язування антитіла з його антигеном у відповідному конкурентному аналізі на 50 % або більше. Також як приклад, для визначення того, чи зв'язується антитіло з тим самим епітопом, що й еталонне антитіло, еталонному антитілу дають змогу зв'язуватися з VEGF-A або ANG2 за умов насичення. Після видалення надлишку еталонного антитіла

оцінюють здатність антитіла, що цікавить, зв'язуватися з VEGF-A або ANG2. Якщо антитіло, що цікавить, здатне зв'язуватися з VEGF-A або ANG2 після насичення зв'язування еталонного антитіла, можна зробити висновок, що антитіло, що цікавить, зв'язується з іншим епітопом відносно еталонного антитіла. Але якщо антитіло, що цікавить, не здатне зв'язуватися з VEGF-A або ANG2 після насичення зв'язування еталонного антитіла, тоді антитіло, що цікавить, може зв'язуватися з тим самим епітопом, що й епітоп, який зв'язується еталонним антитілом. Для підтвердження того, чи зв'язується антитіло, що цікавить, з тим самим епітопом або тільки заважає зв'язуванню через стеричні причини, можна використовувати рутинні експерименти (наприклад, аналізи мутацій та зв'язування пептидів за допомогою ІФА, РІА, поверхневого плазмонного резонансу, цитометрії в потоці або будь-якого іншого кількісного або якісного аналізу зв'язування антитіл, доступного в даній галузі). Цей аналіз можна проводити у двох установках, тобто з обома антитілами, які є антитілом, що насичує. Якщо в обох установках тільки перше (що насичує) антитіло здатне зв'язуватися з VEGF-A або ANG2, тоді можна зробити висновок, що антитіло, яке цікавить, та еталонне антитіло конкурують стосовно зв'язування з VEGF-A або ANG2.

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

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

"Відсоток (%) ідентичності амінокислотної послідовності" щодо еталонної поліпептидної послідовності визначають як відсоткову долю амінокислотних залишків у кандидатній послідовності, які є ідентичними з амінокислотними залишками в еталонній поліпептидній послідовності, після вирівнювання послідовностей і внесення, за необхідності, гепів для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовностей, і без урахування будь-яких консервативних заміन як частини ідентичності послідовностей задля вирівнювання. Вирівнювання для цілей визначення відсотка ідентичності амінокислотної послідовності можна здійснювати різними способами, відомими в цій галузі техніки, наприклад, із використанням загальнодоступного комп'ютерного програмного забезпечення, такого як програмне забезпечення BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) або програмний пакет FASTA. Фахівці в цій галузі техніки можуть визначити відповідні параметри для вирівнювання послідовностей, у тому числі будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині послідовностей, що підлягають порівнянню. Як альтернатива, значення процента ідентичності можна одержати за допомогою комп'ютерної програми для порівняння послідовностей ALIGN-2. Комп'ютерна програма для порівняння послідовностей ALIGN-2 була розроблена Genentech, Inc., а вихідний код разом із документацією для користувачів було подано в Бюро реєстрації авторських прав США, Вашингтон, округ Колумбія, 20559, де він зареєстрований під номером реєстрації авторського права США TXU510087 і описаний в WO 2000/005319.

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

"Імунокон'югат" являє собою антитіло, кон'юговане з однією або більше гетерологічними молекулами, включаючи без обмеження цитотоксичний засіб.

Термін "молекула нуклеїнової кислоти" або "полінуклеотид" включає будь-яку сполуку та/або речовину, яка містить полімер з нуклеотидів. Кожний нуклеотид складається з основи, зокрема, пуринової або піримідинової основи (тобто цитозину (C), гуаніну (G), аденіну (A), тиміну (T) або урацилу (U)), цукру (тобто дезоксирибози або рибози) і фосфатної групи. Часто молекула нуклеїнової кислоти описана за послідовністю основ, при цьому зазначені основи представляють первинну структуру (лінійну структуру) молекули нуклеїнової кислоти. Послідовність основ, зазвичай,

представлена від 5' до 3'. В даному документі термін молекула нуклеїнової кислоти охоплює дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК), включаючи, наприклад, комплементарну ДНК (кДНК) і геномну ДНК, рибонуклеїнову кислоту (РНК), зокрема, матричну РНК (мРНК), синтетичні форми ДНК і РНК і змішані полімери, що містять дві або більше з цих молекул. Молекула нуклеїнової кислоти може бути лінійною або кільцевою. Окрім того, термін молекула нуклеїнової кислоти включає як смислові, так і антисмислові ланцюги, а також одноланцюгові та дволанцюгові форми. Окрім цього, описана в цьому документі молекула нуклеїнової кислоти може містити нуклеотиди природного та неприродного походження. Приклади нуклеотидів неприродного походження включають модифіковані нуклеотидні основи з дериватизованими цукрами, або фосфатними кістяковими зв'язками, або хімічно модифікованими залишками. Молекули нуклеїнових кислот також включають молекули ДНК і РНК, придатні як вектор для прямої експресії антитіла за винаходом *in vitro* та/або *in vivo*, наприклад, в організмі хазяїна або пацієнта. Такі ДНК (наприклад, кДНК) або РНК (наприклад, мРНК) вектори можуть бути немодифікованими або модифікованими. Наприклад, мРНК може бути хімічно модифікована для підвищення стабільності РНК-вектора та/або експресії кодованої молекули так, щоб мРНК можна було вводити суб'єкту для генерації антитіл *in vivo* (див., наприклад, Stadler et al, Nature Medicine 2017, опубліковану онлайн 12 червня 2017 р., doi:10.1038/nm.4356 або EP 2101823 B1).

"Виділена" нуклеїнова кислота стосується молекули нуклеїнової кислоти, яка була відокремлена від компонента її природного оточення. Виділена нуклеїнова кислота включає молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які зазвичай містять молекулу нуклеїнової кислоти, але молекула нуклеїнової кислоти присутня позахромосомно або в хромосомній локації, що відрізняється від природної хромосомної локації.

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

Термін "вектор", як використовується в цьому документі, належить до молекули нуклеїнової кислоти, здатної збільшувати число копій іншої нуклеїнової кислоти, з якою вона з'єднана. Цей термін включає вектор як структуру нуклеїнової кислоти зі здатністю до самореплікації, а також вектор, вбудований у геном клітини-хазяїна, в яку його було внесено. Певні вектори здатні управляти експресією нуклеїнових кислот, з якими вони є функціонально зв'язаними. Такі вектори називають в цьому документі "експресійними векторами".

Терміни "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїв" і "культура клітин-хазяїв" використовуються взаємозамінно та стосуються клітин, в які була введена екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство таких клітин. Клітини-хазяї включають "трансформантів" і "трансформовані клітини", які включають первинно трансформовані клітини й одержане від них потомство незалежно від кількості пасажів. Потомство може не бути повністю ідентичним батьківській клітині за вмістом нуклеїнової кислоти та може містити мутації. У даний документ включене мутантне потомство, яке має таку саму функцію або біологічну активність, щодо яких проводять скринінг або відбір початково трансформованих клітин.

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

Термін "фармацевтично прийнятний носій" належить до інгредієнта у фармацевтичній композиції або фармацевтичному препараті, відмінного від активного інгредієнта, який є нетоксичним для суб'єкта. Фармацевтично прийнятний носій включає, без обмеження, буфер, допоміжну речовину, стабілізатор або консервант.

"Терапевтично ефективна кількість" засобу, наприклад, фармацевтичної композиції, стосується кількості, ефективною в дозуваннях і впродовж проміжків часу, необхідних для досягнення бажаного терапевтичного або профілактичного результату.

"Індивідуум" або "суб'єкт" являє собою ссавця. Ссавці включають без обмеження одомашнених тварин (наприклад, корів, овець, котів, собак і коней), приматів (наприклад, людей і приматів, що відрізняються від людей, таких як мавпи), кроликів і гризунів (наприклад, мишей і щурів). У певних варіантах здійснення індивідуум або суб'єкт являє собою людину.

Як використовується в цьому документі, термін "лікування" (і його граматичні варіанти, такі як "лікувати" або "здійснення лікування") належить до клінічного втручання для зміни природного перебігу захворювання індивідуума, якого лікують, і може проводитися як для профілактики, так і під час перебігу клінічної патології. Необхідні ефекти лікування включають без обмеження запобігання появі або повторній появі захворювання, пом'якшення симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, запобігання метастазуванню, зменшення швидкості прогресування захворювання, зменшення інтенсивності або тимчасове полегшення хворобливого стану та ремісію або поліпшення прогнозу. У деяких варіантів здійснення антитіла за цим винаходом

застосовують для затримки розвитку захворювання або для уповільнення прогресування захворювання.

Використовуваний у цьому документі термін "захворювання очей" включає будь-яке захворювання очей, зв'язане з патологічним ангиогенезом та/або атрофією. Захворювання очей може характеризуватися зміненою або нерегульованою проліферацією та/або інвазією нових кровеносних судин у структури тканини ока, такої як сітківка або рогівка. Захворювання очей може характеризуватися атрофією тканини сітківки (фоторецепторів і пігментного епітелію сітківки (ПЕС), що лежить в основі, і хоріокапілярів). Необмежувальні захворювання очей включають, наприклад, ВМД (наприклад, вологу ВМД, суху ВМД, проміжну ВМД, запущену ВМД та географічну атрофію (ГА)), макулярну дегенерацію, макулярний набряк, ДМН (наприклад, фокальний, нецентральный ДМО та дифузний, із залученням центрального відділу сітківки ДМН), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (ДР) (наприклад, проліферативну ДР (ПДР), непроліферативну ДР (НПДР) і висотну ДР), інші зв'язані з ішемією ретинопатії, РН, оклюзію вени сітківки (ОВС) (наприклад, форми, зв'язані з центральною веною (ОЦВС) і гілками вени (ОГВС)), ХНВ (наприклад, міопічну ХНВ), неоваскуляризацію рогівки, захворювання, зв'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, захворювання, зв'язані з неоваскуляризацією сітківки/хоріоїдальною неоваскуляризацією, центральну серозну ретинопатію (ЦСР), патологічну міопію, хворобу Гіппеля-Ліндау, гістоплазмоз ока, СЕВРП, хворобу Коутса, хворобу Норрі, розлади сітківки, зв'язані з синдромом остеопорозу-псевдогліоми (ОППГ), субкон'юнктивальний крововилив, почервоніння райдужної оболонки, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярну глаукому, пігментний ретиніт (ПР), гіпертонічну ретинопатію, ангиоматозну проліферацію сітківки, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію райдужної оболонки, внутрішньоочну неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, кистозний макулярний набряк (КМН), васкуліт, набряк диска зорового нерва, ретиніт, включаючи, окрім іншого, ЦМВ-ретиніт, меланому очей, бластому сітківки, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний кон'юнктивіт і неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт), спадковий амавроз Лебера (також відомий як спадковий амавроз Лебера або САЛ), увеїт (включаючи інфекційний та неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, мультифокальний хоріоїдит), гістоплазмоз очей, блефарит, синдром сухого ока, травматичне ураження очей, хворобу Шегрена та інші офтальмологічні захворювання, причому захворювання або хвороба зв'язана з неоваскуляризацією очей, транссудацією та/або набряком сітківки або атрофією сітківки. Додаткові типові захворювання очей включають ретиношизис (аномальне розщеплення нейросенсорних шарів сітківки), захворювання, зв'язані з почервонінням райдужної оболонки (неоваскуляризація кута передньої камери), і захворювання, викликані атиповою проліферацією судинно-волоконної або волоконної тканини, включаючи всі форми проліферативної вітреоретинопатії. Типові захворювання, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, включають, окрім іншого, епідемічний кератокон'юнктивіт, дефіцит вітаміну А, надмірне носіння контактних лінз, атопічний кератит, верхній лімбальний кератит, сухий кератит крилоподібної плеви, синдром Шегрена, розацею, фліктенульозний кон'юнктивіт, сифіліс, мікобактеріальні інфекції, ліпідну дегенерацію, хімічні опіки, бактеріальні виразки, грибові виразки, інфекції простого герпесу, інфекції оперізувального герпесу, інфекції найпростішими, саркому Капоші, виразку Мурена, маргінальну дегенерацію Террієна, крайову дистрофію рогівки, ревматоїдний артрит, системну вовчанку, поліартеріїт, травму, саркоїдоз Вегенера, склерит, синдром Стівенса-Джонсона, перифіоїдну радіальну кератотомію та відторгнення трансплантата рогівки. Типові захворювання, пов'язані з хоріоїдальною неоваскуляризацією і дефектами в судинній системі сітківки, включаючи підвищену транссудацію, аневризми та капілярне закоркування, включають, окрім іншого, діабетичну ретинопатію, макулярну дегенерацію, серповидноклітинну анемію, саркоїд, сифіліс, еластичну псевдоксантому, хворобу Педжета, оклюзію вени, оклюзію артерії, обструктивну хворобу сонної артерії, хронічний увеїт/вітрит, мікобактеріальні інфекції, хворобу Лайма, системну червону вовчанку, ретинопатію недоношених, набряк сітківки (включаючи макулярний набряк), хворобу Ілза, хворобу Бехчета, інфекції, яка викликають ретиніт або хоріоїдит (наприклад, мультифокальний хоріоїдит), ймовірний гістоплазмоз очей, хворобу Беста (врожену макулярну дегенерацію), міопію, ямки диска зорового нерва, pars planitis, відшарування сітківки (наприклад, хронічне відшарування сітківки), синдром підвищеної в'язкості крові, токсоплазмоз, травму та ускладнення після лазерної корекції. Типові захворювання, пов'язані з атрофією тканин сітківки (фоторецепторів і ПЕС, що лежить в основі), включають, окрім іншого, атрофічну або неекссудативну ВМД (наприклад, географічну атрофію або запущену суху ВМД), атрофію жовтої плями (наприклад, атрофію, зв'язану з неоваскуляризацією та/або географічною атрофією), діабетичну ретинопатію, хворобу Штаргардта, дистрофію очного дна Сорсбі, ретиношизис та пігментний ретиніт.

Термін "вкладення в упаковання" використовують для позначення інструкцій, зазвичай включених у комерційні упаковання терапевтичних продуктів, які містять інформацію про показання, застосування, дозування, введення, комбіновану терапію, протипоказання та/або застереження щодо застосування таких терапевтичних продуктів.

2. Детальний опис варіантів здійснення цього винаходу

В одному аспекті цей винахід оснований, частково, на забезпеченні біспецифічних антитіл для терапевтичного застосування. У деяких аспектах забезпечуються антитіла, які зв'язуються з VEGF-A людини та ANG2 людини. Антитіла за цим винаходом придатні, наприклад, для діагностики або лікування судинних захворювань, наприклад, судинних захворювань очей.

A. Типові антитіла, які зв'язуються з VEGF-A людини та ANG2 людини

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіла, які зв'язуються з VEGF-A людини та ANG2 людини. В одному аспекті запропоновано виділені антитіла, які зв'язуються з VEGF-A людини та ANG2 людини. В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіла, які специфічно зв'язуються з VEGF-A людини та ANG2 людини.

У деяких аспектах запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, причому антитіло містить паратоп VEGF-A (тобто антигензв'язувальний сайт, який зв'язується з VEGF-A) та паратоп ANG2 (тобто антигензв'язувальний сайт, який зв'язується з ANG2) в одній спорідненій парі домену VL та домену VH, причому

- паратоп VEGF-A містить амінокислотні залишки CDR-H2, CDR-L1 та CDR-L3 антитіла, причому паратоп ANG2 містить амінокислотні залишки CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2 антитіла; та/або

- пара варіабельного домену легкого ланцюга та варіабельного домену важкого ланцюга одночасно зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини; та/або

- антитіло зв'язується з тим самим епітопом на VEGF-A людини та з тим самим епітопом на ANG2 людини, що й антитіло з варіабельним доменом важкого ланцюга SEQ ID NO:19 та варіабельним доменом легкого ланцюга SEQ ID NO:20; та/або

- Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF-A121 людини з KD менше ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA, та (ii) з ANG2 людини з KD менше ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA; та/або

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

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

- 20 мМ розчин His/HisHCl з pH 6,0, що містить 180 мг/мл Fab-фрагмента антитіла, має в'язкість менше ніж 20 сП за 20 °C, виявлену за допомогою динамічного розсіювання світла за допомогою способу DLS латексних кульок, як описано в прикладі 8.

В іншому аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.

В іншому аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

В іншому аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить домен VH, який містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66, R94, D95, V96, F98 та F99, та домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y3, Y27, W27a, E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57, Y91, R92, Y93, H94 та P95, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом. В одному варіанті здійснення антитіло містить паратоп VEGF-A, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66 та D95, та наступні амінокислотні залишки в домені VL: I2, Y3, Y27, W27a, E32, R92, Y93, H94 та P95; та паратоп ANG2, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, R94, V96, F98 та F99, та наступні амінокислотні залишки в домені VL: E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57 та Y91.

В іншому аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який

містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20.

В іншому аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19, причому домен VH містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66, R94, D95, V96, F98 та F99; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20, причому домен VL містить амінокислотні залишки I2, Y3, Y27, W27a, E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57, Y91, R92, Y93, H94 та P95, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

В іншому аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20.

В іншому аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19, причому домен VH містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, R66 та R94; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20, причому домен VL містить амінокислотні залишки I2, Y3, L46, F49 та E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

В іншому аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20.

В іншому аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами.

В іншому аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами, причому амінокислотні заміни розташовані в одному або

більше положеннях 1, 2, 4-25, 28, 35d-54, 59, 60, 67-93, 97, 101-113 SEQ ID NO:19; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами, причому амінокислотні заміни розташовані в положеннях 1, 4-26, 27b-27d, 33-45, 47, 48, 51, 52, 58-90, 96-107 SEQ ID NO:20, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

В іншому аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами.

В іншому аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, і яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20 з 1-15, 1-10 або 1-5 амінокислотними замінами.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить домен VH, який має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19. У деяких аспектах послідовність VH, яка має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції у порівнянні з еталонною послідовністю, але антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, яке містить цю послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з VEGF-A людини та ANG2 людини. У деяких аспектах було проведено заміну, вставку та/або делецію загалом 1-10 амінокислот в SEQ ID NO:19. У деяких аспектах заміни, вставки або делеції знаходяться в ділянці за межами CDR (тобто в FR). У конкретному аспекті VH містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3; (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14.

В одному аспекті в цьому винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить домен VL, який має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20. У деяких аспектах послідовність VL, яка має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції у порівнянні з еталонною послідовністю, але антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, яке містить цю послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з VEGF-A людини та ANG2 людини. У деяких аспектах було проведено заміну, вставку та/або делецію загалом 1-10 амінокислот в SEQ ID NO:20. У деяких аспектах заміни, вставки або делеції знаходяться в ділянці за межами CDR (тобто в FR). У конкретному аспекті VL містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.

В іншому аспекті забезпечується антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, причому антитіло містить послідовність VH, як у будь-якому з аспектів, наведених вище, і послідовність VL, як у будь-якому з аспектів, наведених вище. В одному аспекті антитіло містить послідовності VH та VL SEQ ID NO:19 та SEQ ID NO:20, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В іншому аспекті забезпечується антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, причому антитіло містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:24 та амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:25.

В іншому аспекті забезпечується антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, причому антитіло містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:17 і амінокислотну

послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:18.

У додатковому аспекті цього винаходу антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, згідно з будь-яким з вищенаведених аспектів, є моноклональним антитілом. В одному аспекті антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, є фрагментом антитіла, наприклад, фрагментом Fv, Fab, Fab', scFv, діатілом або F(ab')₂. В іншому аспекті антитіло являє собою повнорозмірне антитіло.

В додатковому аспекті антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, згідно з будь-яким з вищенаведених аспектів може включати будь-яку з ознак, окремо або в комбінації, як описано в розділах 1-5 нижче.

1. Афіність антитіл

У деяких варіантах здійснення антитіло, запропоноване в цьому документі, зв'язується з VEGF-A з константою дисоціації (K_D) ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ або $\leq 0,01$ нМ. У переважному варіанті здійснення антитіло, запропоноване в цьому документі, зв'язується з VEGF-A людини з константою дисоціації (K_D) ≤ 10 пМ, у переважному варіанті здійснення ≤ 5 пМ. У переважному варіанті здійснення антитіло, запропоноване в цьому документі, зв'язується з VEGFA-121 з константою дисоціації (K_D) ≤ 10 пМ, у переважному варіанті здійснення ≤ 5 пМ. У переважному варіанті здійснення антитіло, запропоноване в цьому документі, зв'язується з VEGFA-165 з константою дисоціації (K_D) ≤ 10 пМ, у переважному варіанті здійснення ≤ 5 пМ.

У деяких варіантах здійснення антитіло, яке зв'язується з ANG2, має константу дисоціації (K_D) ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ або $\leq 0,03$ нМ. У переважному варіанті здійснення антитіло, запропоноване в цьому документі, зв'язується з ANG2 з константою дисоціації (K_D) ≤ 10 пМ, у переважному варіанті здійснення ≤ 5 пМ.

В одному аспекті K_D вимірюють з використанням аналізу методом поверхневого плазмонного резонансу BIACORE®.

В іншому аспекті K_D вимірюють за допомогою аналізу KinExA. В одному варіанті здійснення K_D вимірюють за допомогою аналізу KinExA в умовах, описаних нижче в розділі "Матеріали та загальні методи" для виявлення K_D зв'язування VEGF-A або виявлення K_D зв'язування ANG2.

Наприклад, K_D зв'язування антитіла з VEGF-A вимірюється в аналізі за допомогою приладу KinExA 3200 від Sapidyne Instruments (Boise, ID), кульки PMMA покриваються антигеном відповідно до протоколу довідника KinExA (адсорбційне покриття, Sapidyne) за допомогою 30 мкг антитіла до VEGF MAB293 (R&D) в 1 мл ФСБ (pH 7,4). Аналіз рівноваги KinExA виконується за кімнатної температури з використанням ФСБ pH 7,4 з 0,01 % БСА і 0,01 % Твін20 як робочого буфера, зразки та гранули отримують в буфері LowCross (Candor Bioscience). Використовується швидкість потоку 0,25 мл/хв. Постійну кількість VEGFA-121-His (50 пМ і в другому експерименті 500 пМ) титрують досліджуванним антитілом і врівноважені суміші пропускають через колонку з кульками антитіла до VEGF (Mab293) у системі KinExA об'ємом 750 мкл для 50 пМ постійного VEGF і в об'ємі 125 мкл для 500 пМ постійного VEGF. Виявлення зв'язаного VEGFA-121 виконується за допомогою другого біотинільованого антитіла до VEGF (BAF293) з концентрацією 250 нг/мл і з наступною ін'єкцією 250 нг/мл кон'югату Streptavidin Alexa Fluor™ 647 у буфері для зразків. K_D отримують в нелінійному регресійному аналізі даних з використанням моделі гомогенного зв'язування на одній ділянці, яка міститься в програмному забезпеченні KinExA (версія 4.0.11) за допомогою методу "стандартного аналізу". Програмне забезпечення розраховує K_D і визначає 95 % довірчий інтервал, підганяючи точки даних до теоретичної кривої K_D . 95 % довірчий інтервал задається як низька K_D і висока K_D .

Наприклад, K_D зв'язування антитіла з ANG2 вимірюється в аналізі з використанням приладу KinExA 3200 від Sapidyne Instruments (Boise, ID), гранули PMMA покриваються антигеном відповідно до протоколу довідника KinExA (Adsorption coating, Sapidyne) з використанням 20 мкг антитіла до Ang2 MAB098 (R&D) в 1 мл (pH 7,4). Аналіз рівноваги KinExA виконується за кімнатної температури з використанням ФСБ pH 7,4 з 0,01 % БСА і 0,01 % Твін20 як робочого буфера, зразки та гранули отримують в буфері LowCross (Candor Bioscience). Використовується швидкість потоку 0,25 мл/хв. Постійну кількість Ang2-RBD-muFc (50 пМ і в другому експерименті 500 пМ) титрують досліджуванним антитілом, а врівноважені суміші пропускають через колонку з кульками антитіла до Ang2 (MAB098) у системі KinExA об'ємом 750 мкл для 50 пМ постійного Ang2 і в об'ємі 188 мкл для 500 пМ постійного Ang2. Виявлення зв'язаного Ang2 здійснюється за допомогою другого біотинільованого антитіла до Ang2 (BAM0981) з концентрацією 250 нг/мл і з наступною ін'єкцією 250 нг/мл кон'югату Streptavidin Alexa Fluor™ 647 у буфер для зразків. K_D отримують в нелінійному регресійному аналізі даних з використанням моделі гомогенного зв'язування на одній ділянці, яка міститься в програмному забезпеченні KinExA (версія 4.0.11) за допомогою методу "стандартного аналізу". Програмне забезпечення розраховує K_D і визначає 95 % довірчий інтервал, підганяючи точки даних до теоретичної кривої K_D . 95 % довірчий інтервал задається як низька K_D і висока K_D .

2. Фрагменти антитіл

У деяких аспектах запропоноване в цьому документі антитіло є фрагментом антитіла.

В одному аспекті фрагмент антитіла є фрагментом Fab, Fab', Fab'-SH або F(ab')₂, зокрема Fab-

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

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

У переважному варіанті здійснення запропоноване в цьому документі антитіло являє собою Fab-фрагмент.

В одному варіанті здійснення домен VH запропонованого в цьому документі антитіла містить каркас VH3 людини.

В одному варіанті здійснення домен VL запропонованого в цьому документі антитіла містить каркас V_{каппа}1.

В одному варіанті здійснення домен CL запропонованого в цьому документі антитіла належить до ізо типу каппа.

В одному варіанті здійснення домен CH1 запропонованого в цьому документі антитіла належить до ізо типу IgG1.

У переважному варіанті здійснення запропоноване в цьому документі антитіло є Fab-фрагментом, що містить домен CL ізо типу каппа та домен CH1 ізо типу IgG1 людини.

3. Термічна стабільність

Антитіла, представлені у цьому документі, характеризуються чудовою термічною стабільністю. У деяких варіантах здійснення Fab-фрагмент запропонованого в цьому документі антитіла має температуру початку агрегації 70 °C або вище. У деяких варіантах здійснення Fab-фрагмент запропонованого в цьому документі антитіла має температуру плавлення понад 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіювання світла.

4. Мультиспецифічні антитіла

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

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

5. Варіанти антитіл

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

У деяких аспектах запропоновані варіанти антитіла, які містять одну або більше амінокислотних замін. Сайти, які представляють інтерес для замісного мутагенезу, включають CDR та FR. Консервативні заміни показані в таблиці нижче під заголовком "переважні заміни". Більш суттєві зміни представлені в таблиці 1 під заголовком "типові заміни", і як додатково описано нижче в посиланні на класи амінокислотних бокових ланцюгів. Амінокислотні заміни можна вносити в антитіло, що

представляє інтерес, і проводити скринінг отриманих продуктів відносно необхідної активності, наприклад, збереження/покращення зв'язування антигену, зниження імуногенності або покращення АЗКЦ або КЗЦ.

Таблиця

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

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

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

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

Один з варіантів заміни включає заміну одного або більше амінокислотних залишків CDR батьківського антитіла (наприклад, гуманізованого або людського антитіла). Зазвичай отриманий(і) варіант(и), відібраний(і) для подальшого дослідження, характеризується(ються) модифікаціями (наприклад, покращенням) певних біологічних властивостей (наприклад, підвищеною афінністю, зменшеною імуногенністю) у порівнянні з вихідним антитілом та/або значною мірою зберігає(ють) певні біологічні властивості вихідного антитіла. Типовий замісний варіант являє собою антитіло з дозрілою афінністю, яке зручно отримувати, наприклад, із використанням методик дозрівання афінності на основі фагового дисплею, таких як описані в цьому документі. Коротко один або більше амінокислотних залишків CDR піддають мутації та варіантні антитіла на поверхні фага, і проводять скринінг щодо конкретного виду біологічної активності (наприклад, афінності зв'язування).

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

Зручний метод виявлення залишків або ділянок антитіла, які можуть бути мішенями для мутагенезу, називається "аланін-сканувальним мутагенезом", який описано в Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085. У цьому способі амінокислотний залишок або групу амінокислотних залишків-мішеней (наприклад, заряджені амінокислотні залишки, такі як Arg, Asp, His, Lys і Glu) ідентифікують і замінюють нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою (наприклад, аланіном або поліаланіном) для визначення впливу на взаємодію антитіла з антигеном. Додаткові заміни можна вносити в амінокислотні позиції, які демонструють функціональну чутливість до

початкових заміні. Як альтернатива або на додаток можна використовувати кристалічну структуру комплексу антиген-антитіло для ідентифікації точок контакту між антитілом і антигеном. Такі контактні залишки та сусідні залишки можна націлювати або вилучати з кандидатів для заміни. Можна проводити скринінг варіантів, щоб визначити, чи мають вони необхідні властивості.

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

а) Варіанти за глікозилюванням

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

Якщо антитіло містить Fc-ділянку, можна змінювати приєднаний до неї олігосахарид. Нативні антитіла, які виробляють клітини ссавців, зазвичай містять розгалужений біантенарний олігосахарид, що зазвичай є приєднаним за допомогою N-зв'язку до Asn297 CH2-домену Fc-ділянки. Див., наприклад, Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). Олігосахарид може містити різні вуглеводи, наприклад, манозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу та сіалову кислоту, а також фукозу, приєднану до GlcNAc у "стеблі" біантенарної олігосахаридної структури. У деяких аспектах можна виконати модифікації олігосахариду в антитілі за винаходом для створення варіантів антитіл з певними покращеними властивостями.

В одному аспекті запропоновані варіанти антитіл, які містять нефукозилюваний олігосахарид, тобто олігосахаридну структуру з недостатньою кількістю фукози, приєднаної (безпосередньо або опосередковано) до Fc-ділянки. Такий нефукозилюваний олігосахарид (який також називають "афукозилюваним" олігосахаридом), зокрема представляє N-зв'язаний олігосахарид з недостатньою кількістю фукозного залишку, приєданого до першої GlcNAc в основі біантенарної олігосахаридної структури. В одному аспекті запропоновані варіанти антитіла, які містять збільшену долю нефукозилюваних олігосахаридів у Fc-ділянці у порівнянні з нативним або батьківським антитілом. Наприклад, доля нефукозилюваних олігосахаридів може становити щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 80 % або навіть приблизно 100 % (тобто немає фукозилюваних олігосахаридів). Процент нефукозилюваних олігосахаридів представляє (середню) кількість олігосахаридів без фукозних залишків відносно суми всіх олігосахаридів, приєднаних до Asn 297 (наприклад, складних, гібридних структур та структур з високим вмістом манози), згідно з результатами вимірювання методом мас-спектрометрії MALDI-TOF, наприклад, як описано в WO 2006/082515. Asn297 стосується залишку аспарагіну, розташованого в позиції 297 у Fc-ділянці (згідно з нумерацією EU залишків Fc-ділянки); при цьому Asn297 також може розташовуватися приблизно на ± 3 амінокислот вище або нижче положення 297, тобто між положеннями 294 і 300, внаслідок незначних варіацій у послідовності антитіл. Такі антитіла, які містять збільшену долю нефукозилюваних олігосахаридів у Fc-ділянці, можуть мати покращене зв'язування з рецептором FcγRIIIa та/або покращену ефекторну функцію, зокрема покращену функцію A3KЦ. Див., наприклад, US 2003/0157108; US 2004/0093621.

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

У додатковому аспекті запропоновані варіанти антитіл з роздвоєними олігосахаридами, наприклад, у яких біантенарний олігосахарид, приєднаний до Fc-ділянки антитіла, розділений навпіл GlcNAc. Такі варіанти антитіл можуть мати знижений рівень фукозилювання та/або покращену функцію A3KЦ, як описано вище. Приклади таких варіантів антитіл описані, наприклад, в Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999); Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006); WO 99/54342; WO 2004/065540, WO 2003/011878.

Також запропоновано варіанти антитіл із щонайменше одним залишком галактози в олігосахариді, приєданому до Fc-ділянки. Такі варіанти антитіл можуть мати покращену функцію K3Ц. Такі варіанти антитіл описано, наприклад, у WO 1997/30087; WO 1998/58964 і WO 1999/22764.

б) Варіанти за Fc-ділянкою

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

Згідно з деякими аспектами цей винахід передбачає варіант антитіла, який має деякі, але не всі ефекторні функції, що робить його бажаним кандидатом для варіантів застосування, в яких важливим є період напівжиття антитіла за умов *in vivo*, але при цьому певні ефекторні функції (такі як комплементзалежна цитотоксичність (КЗЦ) та антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність (АЗКЦ)) не потрібні або шкідливі. Для підтвердження зменшення/послаблення КЗЦ-та/або АЗКЦ-активності можна проводити аналіз цитотоксичності *in vitro* та/або *in vivo*. Наприклад, аналізи зв'язування Fc-рецепторів (FcR) можна проводити, щоб впевнитися, що антитіло не зв'язується з FcγR (таким чином, ймовірно, не має активності АЗКЦ), але зберігає здатність зв'язуватися з FcRn. Первинні клітини для опосередкування АЗКЦ, NK-клітини, експресують лише FcγRIII, тоді як моноцити експресують FcγRI, FcγRII та FcγRIII. Експресію FcR на гемопоетичних клітинах описано в таблиці 3 на сторінці 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Необмежувальні приклади методів *in vitro* аналізу для оцінки АЗКЦ-активності молекули, що становить інтерес, описані в патенті США №5500362 (див., наприклад, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) та Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5821337 (див. Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Як альтернатива можна використовувати нерадіоактивні методи аналізу (див., наприклад, нерадіоактивний аналіз цитотоксичності АСТІ™ для проточної цитометрії (CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, Каліфорнія; та нерадіоактивний аналіз цитотоксичності CytoTox 96® (Promega, Мадісон, Вісконсин). Придатні ефекторні клітини для таких аналізів включають мононуклеарні клітини периферичної крові (МПК) і природні клітини-кілери (NK). Альтернативно або додатково, АЗКЦ-активність молекули, що становить інтерес, можна оцінити *in vivo*, наприклад, в моделі на тваринах, як розкрито в Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Також можна проводити аналіз зв'язування C1q, щоб підтвердити, що антитіло не здатне зв'язувати C1q, а отже не має КЗЦ-активності. Див., наприклад, ІФА зв'язування C1q і C3c у WO 2006/029879 і WO 2005/100402. Для того, щоб оцінити активацію комплементу можна виконати аналіз КЗЦ (див., наприклад, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); і Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Визначення зв'язування з FcRn та *in vivo* кліренсу/часу напіввиведення також можна виконати з використанням способів, відомих в цій галузі техніки (див., наприклад, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006); WO 2013/120929 A1).

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

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

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

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

У деяких аспектах зміни зроблені в Fc-ділянці, що зумовило зміни (тобто або до поліпшення, або до погіршення) зв'язування C1q та/або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ), наприклад, як описано в патенті США № 6194551, міжнародній патентній заявці WO 99/51642 і публікації Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Антитіла зі збільшеним періодом напіввиведення та поліпшеним зв'язуванням з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), який відповідає за перенесення материнських IgG до плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), описані в US2005/0014934 (Hinton et al.). Ці антитіла містять Fc-ділянку з однією або більше замінами, які покращують зв'язування Fc-ділянки з FcRn. Такі Fc-варіанти включають варіанти з замінами в одному або більше залишках Fc-ділянки: 238, 252, 254, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378,

380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, заміна залишку 434 Fc-ділянки (див., наприклад, патент США №7371826; Dall'Acqua, W.F., et al. J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524).

Залишки Fc-ділянки, важливі для взаємодії мишачого Fc-мишачого FcRn, були ідентифіковані сайт-направленим мутагенезом (див., наприклад, Dall'Acqua, W.F., et al. J. Immunol 169 (2002) 5171-5180). Залишки I253, H310, H433, N434 та H435 (нумерація згідно з EU-індексом) залучені у взаємодію (Medesan, C., et al., Eur. J. Immunol. 26 (1996) 2533; Firan, M., et al., Int. Immunol. 13 (2001) 993; Kim, J.K., et al., Eur. J. Immunol. 24 (1994) 542). Залишки I253, H310 та H435, як було виявлено, є важливими для взаємодії Fc людини з мишачим FcRn (Kim, J.K., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819). Дослідження комплексу Fc людини-FcRn людини показали, що залишки I253, S254, H435 та Y436 є важливими для взаємодії (Firan, M., et al., Int. Immunol. 13 (2001) 993; Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604). В Yeung, Y.A., et al. (J. Immunol. 182 (2009) 7667-7671) повідомляли та досліджували різні мутанти залишків 248-259, та 301-317, та 376-382, та 424-437.

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

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

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

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

в) Варіанти антитіл, сконструйовані з використанням залишків цистеїну

У деяких аспектах може бути бажаним створення антитіл, сконструйованих із використанням цистеїну, наприклад, антитіл THIOMAB™, в яких один або більше залишків заміщено залишками цистеїну. В конкретних аспектах замінені залишки знаходяться в доступних сайтах антитіла. Шляхом заміни цих залишків цистеїном реакційноздатні тіолові групи розташовуються в доступних сайтах антитіла та можуть бути використані для кон'югації антитіла з іншими фрагментами, наприклад фрагментами лікарського засобу або фрагментами лінкер-лікарський засіб, зі створенням імунокон'югата, додатково описаного в цьому документі. Антитіла, сконструйовані з використанням цистеїну, можна одержати, як описано, наприклад, в патентах США №№ 7521541, 830930, 7855275, 9000130 або в заявці WO 2016040856.

6. Імунокон'югати

У винаході також запропоновані імунокон'югати, які містять запропоноване антитіло за цим документом, кон'юговане (хімічно зв'язане) з одним або більше агентами; в одному варіанті здійснення такими як цитотоксичні агенти, хімотерапевтичні агенти, лікарські засоби, інгібітори росту, токсини (наприклад, білкові токсини, ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження або їхні фрагменти) або радіоактивні ізотопи.

В одному варіанті здійснення у винаході запропоновано імунокон'югати, які містять запропоноване в цьому документі антитіло, кон'юговане з полімером. Використовуваний у цьому документі термін "полімер" включає хімічні полімери та білкові полімери. В одному варіанті здійснення імунокон'югат містить запропоноване в цьому документі антитіло, кон'юговане з подовженим рекомбінантним поліпептидом (XTEN). "Подовжені рекомбінантні поліпептиди" відомі в цій галузі техніки і являють

собою, наприклад, розкриті в US20190083577. В одному варіанті здійснення імунокон'югат містить XTEN (а), який містить послідовність, вибрану з GGSPAGSCTSP, GASASCAPSTG, TAEAGCGTAEAA та GREPTCPAPSG, (б) мають довжину від 36 до 3000 L-амінокислотних залишків та/або (в), де сума гліцину (G), аланіну (A), серину (S), треоніну (T), глутамату (E) та залишки проліну (P) складає більше ніж 90 % від загальної кількості амінокислотних залишків XTEN.

Б. Рекомбінантні методи та композиції

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

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

В одному аспекті запропоновано спосіб одержання антитіла, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, причому вказаний спосіб включає культивування клітини-хазяїна, яка містить нуклеїнову кислоту(и), яка кодує запропоноване вище антитіло, за умов, які придатні для експресії антитіла, і необов'язково виділення антитіла з клітини-хазяїна (або середовища, в якому культивують клітину-хазяїна).

Для рекомбінантного продукування антитіла, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, нуклеїнові кислоти, які кодують антитіло, наприклад, як описано вище, є виділеними та вставленими в один або більше векторів для подальшого клонування та/або експресії в клітині-хазяїні. Такі нуклеїнові кислоти легко виділяти та секвенувати, використовуючи традиційні процедури (наприклад, використовуючи олігонуклеотидні зонди, здатні специфічно зв'язуватись з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла), або одержувати рекомбінантними методами, або одержані хімічним синтезом.

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

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

В одному аспекті клітина-хазяїн є еукаріотичною, наприклад клітиною яєчника китайського хом'яка (CHO) або лімфоїдною клітиною (наприклад, клітиною Y0, NS0, Sp20). В одному переважному варіанті здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину CHO. Отримання антитіл за винаходом у клітинах CHO може покращити введення антитіла крізь шприц.

В. Фармацевтичні композиції

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

Фармацевтичні композиції описаного в цьому документі антитіла, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, отримують шляхом змішування такого антитіла, яке має необхідний ступінь чистоти, з одним або більше необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями (Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії загалом є нетоксичними для реципієнтів у використовуваних дозуваннях та концентраціях та включають, але не обмежуються ними, буферні речовини, наприклад,

гістидин, фосфат, цитрат, ацетат та інші органічні кислоти; антиоксиданти, зокрема аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (наприклад, хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію; хлорид бензетонію; фенол; бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, наприклад метил або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; і м-крезол); низькомолекулярні (містять менше ніж 10 залишків) поліпептиди; білки, наприклад сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, наприклад полівінілпіролідон; амінокислоти, наприклад гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, зокрема глюкозу, манозу або декстрини; хелатувальні агенти, наприклад ЕДТК; цукри, наприклад сахарозу, маніт, трегалозу або сорбіт; солеутворювальні протіони, наприклад натрій; металовмісні комплекси (наприклад, комплекси Zn-білок) та/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, наприклад поліетиленгліколь (ПЕГ). Типові фармацевтично прийнятні носії у цьому документі додатково включають дисперсійні агенти для поглинання лікарських засобів, наприклад розчинні нейтрально-активні глікопротеїни гіалуронідази (sHASEGP), наприклад розчинні глікопротеїни гіалуронідази людини PH-20, наприклад rHuPH20 (HYLENEX®, Halozyme, Inc.). Певні типові sHASEGP та способи застосування, в тому числі rHuPH20, описано в патентних публікаціях США №№2005/0260186 та 2006/0104968. В одному аспекті sHASEGP комбінують з однією або більше додатковими глікозаміногліканазами, такими як хондроїтинази.

Типові композиції ліофілізованих антитіл описані в патенті США № 6267958. Водні композиції антитіл включають описані в патенті США № 6171586 та WO2006/044908, причому останні композиції містять гістидин-ацетатний буфер.

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

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

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

Фармацевтичні композиції, призначені для введення *in vivo*, зазвичай є стерильними. Стерильність можна легко забезпечити, наприклад, за допомогою фільтрування через стерильні фільтрувальні мембрани.

Г. Терапевтичні способи та шляхи введення

Будь-яке з антитіл, які зв'язуються з VEGF-A людини та ANG2 людини, запропонованих в цьому документі, можна використовувати в терапевтичних методах.

В одному аспекті запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, для застосування як лікарського засобу. В додаткових аспектах запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, для застосування в лікуванні судинного захворювання. У деяких аспектах запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, для застосування в способі лікування. У деяких аспектах у винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, для застосування в способі лікування індивідуума, який має судинне захворювання, який включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини. В одному такому аспекті спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу (наприклад, одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти або шести додаткових терапевтичних засобів), наприклад, як описано нижче. В додаткових аспектах у винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, для застосування в інгібуванні ангіогенезу. У деяких аспектах у винаході запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, для застосування в способі інгібування ангіогенезу в індивідуума, який включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, для інгібування ангіогенезу. "Індивідуум" відповідно до будь-якого з наведених вище аспектів переважно являє собою людину.

В додаткових аспектах запропоновано антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, для застосування в лікуванні захворювання очей. В одному варіанті здійснення захворювання очей вибране з ВМД (в одному варіанті здійснення вологої ВМД, сухої ВМД, проміжної ВМД, запущеної ВМД і географічної атрофії (ГА)), макулярної дегенерації, макулярного набряку, ДМН (в

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

У додатковому аспекті в цьому винаході запропоновано застосування антитіла, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, у виробництві або отриманні лікарського засобу. В одному аспекті лікарський засіб призначений для лікування судинного захворювання. У додатковому аспекті лікарський засіб призначений для застосування в способі лікування захворювання, який включає введення індивідууму, який має судинне захворювання, ефективної кількості лікарського засобу. В одному такому аспекті вказаний спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу, наприклад, як описано нижче.

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

У додатковому аспекті в цьому винаході запропоновано спосіб лікування судинного захворювання. В одному аспекті спосіб включає введення індивідууму, який має таке судинне захворювання, ефективної кількості антитіла, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини. В одному такому аспекті вказаний спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу, як описано нижче.

У додатковому аспекті в цьому винаході запропоновано спосіб лікування захворювання очей. В одному аспекті спосіб включає введення індивідууму, який має таке захворювання очей, ефективної кількості антитіла, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини. В одному такому аспекті вказаний спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу, як описано нижче.

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

У додатковому аспекті в цьому винаході запропоновано фармацевтичні композиції, які містять будь-яке з запропонованих у цьому документі антитіл, які зв'язуються з VEGF-A людини та ANG2 людини, наприклад, для застосування у будь-якому з вищевказаних терапевтичних способів. В одному аспекті фармацевтична композиція містить будь-яке з запропонованих у цьому документі антитіл, які зв'язуються з VEGF-A людини та ANG2 людини, і фармацевтично прийнятний носій. В іншому аспекті фармацевтична композиція містить будь-яке з запропонованих у цьому документі антитіл, які зв'язуються з VEGF-A людини та ANG2 людини, і щонайменше один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, як описано нижче.

Антитіло за винаходом можна вводити шляхом інтравітреального введення (наприклад, інтравітреальної ін'єкції) або за допомогою порт-пристрою доставлення. В одному варіанті здійснення антитіло згідно з винаходом вводять за допомогою порт-пристрою доставлення протягом шести місяців або більше, в одному варіанті здійснення 8 місяців або більше, в одному варіанті здійснення 9

місяців або більше, в одному варіанті здійснення 12 місяців або більше до заправлення порт-пристрою доставлення. В одному варіанті здійснення антитіло згідно з винаходом вводять за допомогою порт-пристрою доставлення, причому антитіло вводять у порт-пристрійдоставлення через порт у концентрації 150 мг/мл або більше, в одному варіанті в концентрації 200 мг/мл або більше.

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

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

У деяких випадках представлено у цьому документі антитіло, яке зв'язується з VEGF-А людини та ANG2 людини, можна вводити в комбінації щонайменше з одним додатковим терапевтичним засобом для лікування розладу очей, наприклад, розладу очей, описаного в цьому документі (наприклад, ВМД (наприклад, вологої ВМД), ДМН, ДР, ОВС або ГА).

Будь-який придатний терапевтичний засіб від ВМД можна вводити як додатковий терапевтичний засіб у комбінації з представленим у цьому документі антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та ANG2 людини, для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА), включаючи, окрім іншого, антагоніст VEGF, наприклад, антитіло до VEGF (наприклад, LUCENTIS® (ранібізумаб), RTH-258 (раніше ESBA-1008, одноланцюговий фрагмент антитіла до VEGF; Novartis), або біспецифічне антитіло до VEGF (наприклад, біспецифічне антитіло до VEGF/до ангіопоетину 2, таке як фаріцімаб; Roche)), розчинний злитий білок рецептора VEGF (наприклад, EYLEA® (афліберцепт)), DARPIn® до VEGF (наприклад, абіципар пегол; Molecular Partners AG/Allergan), або аптамер до VEGF (наприклад, MACUGEN® (пегаптаніб натрію)); антагоніст фактора росту, одержаного з тромбоцитів (PDGF), наприклад, антитіло до PDGF, антитіло до PDGFR (наприклад, REGN2176-3), пегільований аптамер до PDGF-BB (наприклад, FOVISTA®; Ophthotech/Novartis), розчинний злитий білок рецептора PDGFR або подвійний антагоніст PDGF/VEGF (наприклад, низькомолекулярний інгібітор (наприклад, DE-120 (Santen) або X-82 (TyrogeneX)) або біспецифічне антитіло до PDGF/до VEGF)); VISUDYNE® (вертепорфін) у комбінації з фотодинамічною терапією; антиоксидант; антагоніст системи комплементу, наприклад, антагоніст фактора комплементу C5 (наприклад, низькомолекулярний інгібітор (наприклад, ARC-1905; Ophthotech) або антитіло до C5 (наприклад, LFG-316; Novartis), антагоніст пропердину (наприклад, антитіло до пропердину, наприклад, CLG-561; Alcon), або антагоніст фактора комплементу D (наприклад, антитіло до фактора комплементу D, наприклад, лампалізумаб; Roche)); C3-блокувальний пептид (наприклад, APL-2, Appellis); модифікатор циклу перетворень родопсину (наприклад, гідрохлорид еміксустату); скваламін (наприклад, OHR-102; Ohr Pharmaceutical); вітамінні та мінеральні добавки (наприклад, описані в дослідженні 1 (AREDS1; цинк та/або антиоксиданти) і дослідженні 2-х вікових захворювань очей (AREDS2; цинк, антиоксиданти, лютеїн, зеаксанти та/або омега-3 жирні кислоти)); клітинну терапію, наприклад, NT-501 (Renexus); PH-05206388 (Pfizer), трансплантацію клітин huCNS-SC (StemCells), CNTO-2476 (лінія стовбурових клітин пуповини; Janssen), OpRegen (суспензія клітин RPE; Cell Cure Neurosciences) або трансплантацію клітин MA09-hRPE (Ocata Therapeutics); антагоніст тканинного фактора (наприклад, hI-con1; Iconic Therapeutics); агоніст альфа-адренергічного рецептора (наприклад, тартрат бримонідину; Allergan); пептидну вакцину (наприклад, S-646240; Shionogi); антагоніст амілоїду-бета (наприклад, моноклональне антитіло до амілоїду-бета, наприклад, GSK-933776); антагоніст S1P (наприклад, антитіло до S1P, наприклад, iSONEP™; Lpath Inc); антагоніст ROBO4 (наприклад, антитіло до ROBO4, наприклад, DS-7080a; Daiichi Sankyo); лентивірусний вектор, який експресує ендостатин і ангіостатин (наприклад, RetinoStat); і будь-яку їх комбінацію. У деяких випадках терапевтичні засоби від ВМД (включаючи будь-які з попередніх терапевтичних засобів від ВМД) можуть бути складені разом. Наприклад, антитіло до PDGFR REGN2176-3 можна складати разом з афліберцептом (EYLEA®). У деяких випадках такий об'єднаний препарат можна вводити в комбінації з антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та ANG2 людини, за цим винаходом. У деяких випадках розлад очей являє собою ВМД (наприклад, вологу ВМД).

Будь-який терапевтичний засіб від ДМН та/або ДР можна вводити у комбінації з антитілом, яке зв'язується з VEGF людини та ANG2 людини, за цим винаходом для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА), включаючи, окрім іншого, антагоніст VEGF (наприклад, LUCENTIS® або EYLEA®), кортикостероїд (наприклад, кортикостероїдний імплант (наприклад, OZURDEX® (інтравітреальний імплант дексаметазону) або ILUVIEN® (інтравітреальний імплант ацетоніду флуоцинолону)) або кортикостероїд, складений для введення інтравітреальною ін'єкцією

(наприклад, ацетонід триамцінолону)), або їх комбінації. У деяких випадках розлад очей являє собою ДМН та/або ДР.

Запропоноване в цьому документі антитіло, яке зв'язується з VEGF людини та ANG2 людини, можна вводити в комбінації з терапією або хірургічною процедурою для лікування розладу очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, ОВС або ГА), включаючи, наприклад, лазерну фотокоагуляцію (наприклад, панретинальну фотокоагуляцію сітківки (ПФС)), лазерну обробку друз, хірургію макулярної діри, макулярну транслокаційну хірургію, мініатюрні телескопічні пристрої, що імплантуються, ангіографію PHI-motion (також відому як мікролазерна терапія і лікування живильних судин), терапію протонним пучком, мікростимуляційну терапію, хірургію відшарування сітківки та склоподібного тіла, пломбування склери, субмакулярну хірургію, транспупілярну термотерапію, терапію з використанням фотосистеми I, використання РНК-інтерференції (РНКі), екстракорпоральний реофоре́з (також відомий як мембранна диференційна фільтрація та реотерапія), імплантацію мікрочіпа, терапію стовбуровими клітинами, генно-замісну терапію, генну терапію з використанням рибозимів (включаючи генну терапію для чутливого до гіпоксії елемента, Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; і генну терапію PDEF, GenVec), трансплантацію фоторецепторів/клітин сітківки (включаючи епітеліальні клітини сітківки, що трансплантуються, Diacrin, Inc.; трансплантат клітин сітківки, наприклад, Astellas Pharma US, Inc., ReNeuron, CHA Biotech), акупунктуру і їх комбінації.

Такі види комбінованої терапії, вказані вище, охоплюють комбіноване введення (при якому два або більше терапевтичних засобів включені в один і той же або окремі препарати) і роздільне введення, і в цьому випадку введення антитіла, яке зв'язується з VEGF людини та ANG2 людини, за цим винаходом може відбуватися до, одночасно та/або після введення додаткового терапевтичного засобу або засобів. В одному варіанті здійснення введення антитіла, яке зв'язується з VEGF людини та ANG2 людини, за цим винаходом і введення додаткового терапевтичного засобу може розділяти приблизно один, два, три, чотири або п'ять місяців, або приблизно один, два або три тижні, або приблизно одна, дві, три, чотири, п'ять або шість діб.

Антитіло за цим винаходом (та будь-який додатковий терапевтичний засіб) можна вводити будь-якими придатними способами, зокрема, парентеральним, внутрішньолегеневим та інтраназальним, і, якщо це бажано для місцевого лікування, вводити внутрішньоосередково. Парентеральні інфузії включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревинне або підшкірне введення. Введення можна здійснити будь-яким відповідним шляхом, наприклад, шляхом ін'єкції, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, частково в залежності від того, це являє собою короткочасне чи хронічне введення. У цьому документі передбачено різні схеми введення доз, в тому числі без обмеження одноразові або багаторазові введення у різні часові точки, болюсне введення та імпульсна інфузія.

Антитіла за цим винаходом складають, дозують і вводять способом, який відповідає вимогам належної медичної практики. Фактори, які необхідно враховувати в цьому контексті, включають конкретне порушення, що підлягає лікуванню, конкретного ссавця, що підлягає лікуванню, клінічний стан окремого пацієнта, причину порушення, місце доставлення засобу, спосіб введення, графік введення й інші чинники, відомі лікарям, що практикують. Антитіло необов'язково складають з одним або більше засобами, які застосовують в цей час для профілактики або лікування порушення, що розглядається. Ефективна кількість таких інших агентів залежить від кількості антитіла, присутнього в фармацевтичній композиції, типу розладу або лікування та інших чинників, які обговорювалися вище. Інші засоби зазвичай застосовують у таких самих дозуваннях і вводять шляхами, описаними в цьому документі, або в дозуваннях, що становлять від приблизно 1 до 99 % дозувань, описаних у цьому документі, або у будь-якому дозуванні та будь-яким шляхом, які було емпірично/клінічно визначено як відповідні.

Для запобігання або лікування захворювання відповідне дозування антитіла за цим винаходом (у разі використання окремо або в комбінації з одним або більше іншими додатковими терапевтичними засобами) буде залежати від типу захворювання, що підлягає лікуванню, типу антитіла, тяжкості та перебігу захворювання, того, вводять антитіло з профілактичною або терапевтичною метою, попередньої терапії, історії хвороби пацієнта та відповіді на антитіло, а також рішення лікаря. Антитіло вводять пацієнту придатним чином за один раз або протягом серії процедур. В залежності від типу та тяжкості захворювання початкове можливе дозування для введення пацієнту може становити від приблизно 1 мкг/кг до 15 мкг/кг (наприклад, 0,1 мкг/кг-10 мкг/кг) антитіла, наприклад, за одне або більше окремих введень або безперервною інфузією. Одна типова добова доза може знаходитися у межах від приблизно 1 мкг/кг до 100 мкг/кг або більше, залежно від факторів, згадуваних вище. У разі повторюваних введень протягом декількох днів або довше, залежно від стану, лікування зазвичай підтримують доти, доки не настає необхідне пригнічення симптомів захворювання. Одна типова доза антитіла знаходиться в діапазоні від приблизно 0,05 мкг/кг до приблизно 10 мкг/кг. Отже, пацієнту можна вводити одну або більше доз, що становлять приблизно 0,5 мкг/кг, 2,0 мкг/кг, 4,0 мкг/кг або 10 мкг/кг (або будь-яку їхню комбінацію). Такі дози можна вводити з інтервалами, наприклад, щотижня або кожні три тижні (наприклад, щоб пацієнт одержував від приблизно двох до приблизно двадцяти або, наприклад,

приблизно шести доз антитіла). Можна вводити початкову вищу навантажувальну дозу, а потім одну або більше нижчих доз. Ефективність такої терапії легко контролювати за допомогою традиційних методик і аналізів.

Д. Готові вироби

В іншому аспекті цього винаходу представлено готовий виріб, що містить матеріали, які є ефективними для лікування, запобігання та/або діагностики порушень, описаних вище. Готовий виріб містить контейнер та етикетку або вкладення в упакування, які знаходяться на контейнері або в поєднанні з ним. Відповідні контейнери включають, наприклад, флакони, шприці тощо. Контейнери можна сформувати з різних матеріалів, наприклад, зі скла або пластику. Контейнер містить композицію, яка знаходиться сама по собі або в комбінації з іншою композицією, ефективною для лікування, запобігання та/або діагностики стану, та може мати стерильний порт доступу (наприклад, контейнер може являти собою мішок для внутрішньовенного розчину або флакон, що має пробку, яку проколюють гіподермічною голкою для ін'єкцій). Щонайменше один активний засіб у композиції являє собою антитіло за цим винаходом. На етикетці або вкладенні в упакуванні зазначено, що композицію застосовують для лікування вибраного стану.

Окрім того, готовий виріб може містити (а) перший контейнер із композицією, що міститься в ньому, причому композиція містить антитіло за винаходом; та (б) другий контейнер із композицією, що міститься в ньому, причому композиція містить додатковий цитотоксичний або інший терапевтичний засіб. Готовий виріб у цьому аспекті за цим винаходом може додатково містити вкладення в упакування, на якому зазначено, що композиції можна використовувати для лікування конкретного патологічного стану. Як альтернатива або додатково готовий виріб може додатково містити другий (або третій) контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, наприклад, бактеріостатичну воду для ін'єкцій (BWI), фосфатно-сольовий буферний розчин, розчин Рінгера та розчин декстрази. Він може додатково містити інші матеріали, необхідні з комерційної або споживацької точки зору, зокрема, інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки та шприці.

Е. Пристрої

Антитіло за винаходом можна вводити в око за допомогою очного імпланту, в одному варіанті здійснення з використанням порт-пристрою доставлення.

Порт-пристрій доставлення являє собою імплантований пристрій, який можна повторно направляти, який може вивільняти терапевтичний засіб (наприклад, антитіло за винаходом) протягом кількох місяців (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 і більше місяців). Приклади порт-пристроїв доставлення, які можна використовувати, включають пристрої від ForSight Labs, LLC та/або ForSight VISION4, наприклад, як описано в публікаціях міжнародних патентних заявок № WO 2010/088548, WO2015/085234, WO 2013/116061, WO 2012/ 019176, WO 2013/040247 і WO 2012/019047, які повністю включені в цей документ за допомогою посилання.

Наприклад, у винаході запропоновано порт-пристрої доставлення, які включають резервуари, що містять будь-які антитіла, описані в цьому документі. Порт-пристрій доставлення може додатково включати проксимальну область, трубчастий корпус, з'єднаний з проксимальною областю в рідинному сполученні з резервуаром, і один або більше вихідних отворів в рідинному сполученні з резервуаром і виконаних з можливістю вивільнення композиції в око. Трубчастий корпус може мати зовнішній діаметр, сконфігурований для введення через розріз або отвір в оці приблизно 0,5 мм або менше. Пристрій може мати довжину від приблизно 1 мм до приблизно 15 мм (наприклад, приблизно 1 мм, приблизно 2 мм, приблизно 4 мм, приблизно 5 мм, приблизно 6 мм, приблизно 7 мм, приблизно 9 мм, приблизно 11 мм, приблизно 13 мм або приблизно 15 мм у довжину). Резервуар може мати будь-який відповідний обсяг. У деяких випадках резервуар має об'єм від приблизно 1 мкл до приблизно 100 мкл (наприклад, приблизно 1 мкл, приблизно 5 мкл, приблизно 10 мкл, приблизно 20 мкл, приблизно 50 мкл, приблизно 75 мкл або приблизно 100 мкл). Пристрій або його складові частини можуть бути виготовлені з будь-якого відповідного матеріалу, наприклад, полііміду.

У деяких випадках порт-пристрій доставлення включає резервуар, що містить будь-які антитіла, описані в цьому документі, та одну або більше додаткових сполук.

У деяких випадках порт-пристрій доставлення містить будь-яке з антитіл або кон'югатів антитіл, описаних у цьому документі, і додатковий антагоніст VEGF.

3. Конкретні варіанти здійснення цього винаходу

Далі перераховані конкретні варіанти здійснення цього винаходу.

1. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить паратоп VEGF-A та паратоп ANG2 в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) та варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому паратоп VEGF-A містить амінокислотні залишки з CDR-H2, CDR-L1 та CDR-L3 антитіла, причому паратоп ANG2 містить амінокислотні залишки з CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2 антитіла.

2. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить паратоп VEGF-A та паратоп ANG2 в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) та варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому пара варіабельного домену легкого

ланцюга та варіабельного домену важкого ланцюга одночасно зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини.

3. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить паратоп VEGF-A та паратоп ANG2 в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) і варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому антитіло зв'язується з тим же епітопом на VEGF-A людини та з тим же епітопом на ANG2 людини, що й антитіло з варіабельним доменом важкого ланцюга SEQ ID NO:19 та варіабельним доменом легкого ланцюга SEQ ID NO:20.

4. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить паратоп VEGF-A та паратоп ANG2 в одній спорідненій парі варіабельного домену легкого ланцюга (домену VL) і варіабельного домену важкого ланцюга (домену VH), причому

- паратоп VEGF-A містить амінокислотні залишки з CDR-H2, CDR-L1 та CDR-L3 антитіла, причому паратоп ANG2 містить амінокислотні залишки з CDR-H1, CDR-H3 та CDR-L2 антитіла; та/або

- пара варіабельного домену легкого ланцюга та варіабельного домену важкого ланцюга одночасно зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини; та/або

- антитіло зв'язується з тим самим епітопом на VEGF-A людини та з тим самим епітопом на ANG2 людини, що й антитіло з варіабельним доменом важкого ланцюга SEQ ID NO:19 та варіабельним доменом легкого ланцюга SEQ ID NO:20; та/або

- Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF-A121 людини з KD менше ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA, та (ii) з ANG2 людини з KD менше ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA; та/або

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

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

- 20 мМ розчин His/HisHCl з pH 6,0, що містить 180 мг/мл Fab-фрагмента антитіла, має в'язкість менше ніж 20 сП за 20 °C, виявлену за допомогою динамічного розсіювання світла за допомогою способу DLS латексних кульок, як описано в прикладі 8.

5. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.

6. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.

7. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

8. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

9. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, яке містить домен VH, який містить

амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66, R94, D95, V96, F98 та F99, та домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y3, Y27, W27a, E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57, Y91, R92, Y93, H94 та P95, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

10. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, причому антитіло містить амінокислотні залишки, які містяться в паратопі VEGF-A та в паратопі ANG2 антитіла, що має домен VH SEQ ID NO:19 та домен VL SEQ ID NO:20.

11. Антитіло за варіантом здійснення 9 або 10, яке містить

- паратоп VEGF-A, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66 та D95, і наступні амінокислотні залишки в домені VL: I2, Y3, Y27, W27a, E32, R92, Y93, H94 і P95; та

- паратоп ANG2, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, R94, V96, F98 та F99, і наступні амінокислотні залишки в домені VL: E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57 і Y91.

12. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить домен VH, який містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66, R94, D95, V96, F98 та F99, та домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y3, Y27, W27a, E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57, Y91, R92, Y93, H94 та P95, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

13. Антитіло за варіантом здійснення 12, яке містить

- паратоп VEGF-A, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66 та D95, і наступні амінокислотні залишки в домені VL: I2, Y3, Y27, W27a, E32, R92, Y93, H94 і P95; та

- паратоп ANG2, який містить наступні амінокислотні залишки в домені VH: H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, R94, V96, F98 та F99, і наступні амінокислотні залишки в домені VL: E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57 і Y91.

14. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20.

15. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19, причому домен VH містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66, R94, D95, V96, F98 та F99; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20, причому домен VL містить амінокислотні залишки I2, Y3, Y27, W27a, E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57, Y91, R92, Y93, H94 та P95, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

16. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20.

17. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:19, причому домен VH містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, R66 та R94; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:20, причому домен VL містить амінокислотні залишки I2, Y3, L46, F49 та E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

18. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (і) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (і) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:20.

19. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19 з до 15 амінокислотних замін; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20 з до 15 амінокислотних замін.

20. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19 з до 15 амінокислотних замін, причому амінокислотні заміни розташовані в одному або більше положеннях 1, 2, 4-25, 28, 35d-54, 59, 60, 67-93, 97, 101-113 SEQ ID NO:19; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20 з до 15 амінокислотних замін, причому амінокислотні заміни розташовані в положеннях 1, 4-26, 27b-27d, 33-45, 47, 48, 51, 52, 58-90, 96-107 SEQ ID NO:20, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом.

21. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19 з до 15 амінокислотних замін; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20 з до 15 амінокислотних замін.

22. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (і) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (і) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, і яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19 з до 15 амінокислотних замін; та (б) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20 з до 15 амінокислотних замін.

23. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, яке містить послідовність VH SEQ ID NO:19 та послідовність VL SEQ ID NO:20.

24. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить послідовність VH SEQ ID NO:19 та послідовність VL SEQ ID NO:20.

25. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, яке містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:24 та амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:25.

26. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:24 та амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:25.

27. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, яке містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:17 та амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:18.

28. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:17 та амінокислотну послідовність легкого

ланцюга SEQ ID NO:18.

29. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, у якому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF-A121 людини з KD менше ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA, та (ii) з ANG2 людини з KD менш ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA.

30. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF-A121 людини з KD менше ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA, та (ii) з VEGF-A121 людини з KD менш ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA.

31. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF-A121 людини з KD менше ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA, та (ii) з ANG2 людини з KD менш ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA.

32. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF-A121 людини з KD менше ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA, та (ii) з ANG2 людини з KD менш ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA.

33. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить в одній парі домену VH та VL: (i) домен VH, який містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66, R94, D95, V96, F98 та F99, та (ii) домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y3, Y27, W27a, E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57, Y91, R92, Y93, H94 та P95, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF-A121 людини з KD менше ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA, та (ii) з ANG2 людини з KD менш ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA.

34. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:20; причому Fab-фрагмент антитіла зв'язується (i) з VEGF-A121 людини з KD менше ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA, та (ii) з ANG2 людини з KD менш ніж 50 пМ, що вимірюється за допомогою KinExA.

35. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації 70 °C і більше.

36. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації 70 °C і більше.

37. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації 70 °C і більше.

38. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б)

CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (і) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (і) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації 70 °C і більше.

39. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить в одній парі домену VH та VL: (і) домен VH, який містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66, R94, D95, V96, F98 та F99, та (ii) домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y3, Y27, W27a, E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57, Y91, R92, Y93, H94 та P95, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації 70 °C і більше.

40. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:20; причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою початку агрегації 70 °C і більше.

41. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіювання світла.

42. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіювання світла.

43. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіювання світла.

44. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (і) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (і) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіювання світла.

45. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить в одній парі домену VH та VL: (і) домен VH, який містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66, R94, D95, V96, F98 та F99, та (ii) домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y3, Y27, W27a, E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57, Y91, R92, Y93, H94 та P95, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіювання світла.

46. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло

містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:20; причому Fab-фрагмент антитіла характеризується температурою плавлення більше ніж 80 °C, що вимірюється за допомогою динамічного розсіювання світла.

47. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, причому 20 мМ розчин His/HisHCl з pH 6,0, що містить 180 мг/мл Fab-фрагмента антитіла, має в'язкість менше ніж 20 сП за 20 °C, виявлену за допомогою динамічного розсіювання світла за допомогою способу DLS латексних кульок, як описано в прикладі 8.

48. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та ANG2 людини, причому 20 мМ розчин His/HisHCl з pH 6,0, що містить 180 мг/мл Fab-фрагмента антитіла, має в'язкість менше ніж 20 сП за 20 °C, виявлену за допомогою динамічного розсіювання світла за допомогою способу DLS латексних кульок, як описано в прикладі 8.

49. Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, і домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, причому 20 мМ розчин His/HisHCl з pH 6,0, що містить 180 мг/мл Fab-фрагмента антитіла, має в'язкість менше ніж 20 сП за 20 °C, виявлену за допомогою динамічного розсіювання світла за допомогою способу DLS латексних кульок, як описано в прикладі 8.

50. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, (г) каркас важкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29 та Y30, (ii) FR3, яка містить амінокислотні залишки R66 та R94; та домен VL, який містить (д) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (е) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, (ж) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, та (и) каркас легкого ланцюга людини з (i) FR1, яка містить амінокислотні залишки I2 та Y3, (ii) FR2, яка містить амінокислотні залишки L46 та F49, (iii) FR3, яка містить амінокислотний залишок E57, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому 20 мМ розчин His/HisHCl з pH 6,0, що містить 180 мг/мл Fab-фрагмента антитіла, має в'язкість менше ніж 20 сП за 20 °C, виявлену за допомогою динамічного розсіювання світла за допомогою способу DLS латексних кульок, як описано в прикладі 8.

51. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, яке містить в одній парі домену VH та VL: (i) домен VH, який містить амінокислотні залишки H3, D26, F27, E29, Y30, D35b, D35c, D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65, R66, R94, D95, V96, F98 та F99, та (ii) домен VL, який містить амінокислотні залишки I2, Y3, Y27, W27a, E32, L46, F49, D50, F53, K54, V55, Y56, E57, Y91, R92, Y93, H94 та P95, при цьому нумерація в доменах VH та VL представлена згідно з системою нумерації за Кабатом, причому 20 мМ розчин His/HisHCl з pH 6,0, що містить 180 мг/мл Fab-фрагмента антитіла, має в'язкість менше ніж 20 сП за 20 °C, виявлену за допомогою динамічного розсіювання світла за допомогою способу DLS латексних кульок, як описано в прикладі 8.

52. Антитіло, яке специфічно зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, причому антитіло містить домен VH, який містить (а) CDR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, (б) CDR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, та (в) CDR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, та домен VL, який містить (г) CDR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (д) CDR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:23, та (е) CDR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, яке містить (а) домен VH, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:19; та (б) домен VL, який містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO:20; причому 20 мМ розчин His/HisHCl з pH 6,0, що містить 180 мг/мл Fab-фрагмента антитіла, має в'язкість менше ніж 20 сП за 20 °C, виявлену за допомогою динамічного розсіювання світла за допомогою способу DLS латексних кульок, як описано в прикладі 8.

53. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, яке є моноклональним антитілом.

54. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, яке є фрагментом антитіла, який

зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини.

55. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, причому антитіло є біспецифічним.

56. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, причому антитіло є Fab-фрагментом.

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

58. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, причому антитіло є мультиспецифічним антитілом.

59. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, причому антитіло специфічно зв'язується з VEGF-A людини.

60. Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, причому антитіло специфічно зв'язується з ANG2 людини.

61. Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло за будь-яким із варіантів здійснення 1-58.

62. Клітина-хазяїн, яка містить нуклеїнову кислоту за варіантом здійснення 59.

63. Експресійний вектор, який містить нуклеїнову кислоту за варіантом здійснення 61.

64. Спосіб одержання антитіла, яке зв'язується з VEGF-A людини та з ANG2 людини, який включає культивування клітини-хазяїна за варіантом здійснення 60 так, щоб одержати антитіло.

65. Спосіб за варіантом здійснення 64, який додатково включає вилучення антитіла з клітини-хазяїна.

66. Спосіб за варіантом здійснення 64 або 65 в якому клітиною-хазяїном є клітина E. coli.

67. Спосіб за варіантом здійснення 64 або 65, в якому клітиною-хазяїном є клітина CHO.

68. Антитіло, одержане способом за варіантом здійснення 64 або 65.

69. Фармацевтичний склад, який містить антитіло за будь-яким із варіантів здійснення 1-60 та фармацевтично прийнятний носій.

70. Антитіло за будь-яким із варіантів здійснення 1-60 для застосування як лікарського засобу.

71. Антитіло за будь-яким із варіантів здійснення 1-60 для застосування в лікуванні судинного захворювання.

72. Антитіло за будь-яким із варіантів здійснення 1-60 для застосування в лікуванні судинного захворювання очей.

73. Застосування антитіла за будь-яким із варіантів здійснення 1-60 або фармацевтичної композиції за варіантом здійснення 65 у виробництві лікарського засобу.

74. Застосування антитіла за будь-яким із варіантів здійснення 1-60 або фармацевтичної композиції за варіантом здійснення 65 у виробництві лікарського засобу для інгібування ангиогенезу.

75. Спосіб лікування індивідуума, який має судинне захворювання, який включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла за будь-яким з варіантів здійснення 1-60 або фармацевтичного складу за варіантом здійснення 69.

76. Спосіб лікування індивідуума, який має судинне захворювання очей, який включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла за будь-яким з варіантів здійснення 1-60 або фармацевтичного складу за варіантом здійснення 69.

77. Спосіб інгібування ангиогенезу в індивідуума, який включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла за будь-яким з варіантів здійснення 1-60 або фармацевтичного складу за варіантом здійснення 69 для інгібування ангиогенезу.

78. Порт-пристрій доставлення, який містить антитіло за будь-яким із варіантів здійснення 1-60 або фармацевтичний склад за варіантом здійснення 69.

79. Антитіло за будь-яким із варіантів здійснення 1-60 або фармацевтичний склад за варіантом здійснення 69 для введення в око за допомогою порт-пристрою доставлення.

80. Антитіло за будь-яким із варіантів здійснення 1-60 або фармацевтична композиція за варіантом здійснення 69 для введення в око за допомогою порт-пристрою доставлення за варіантом здійснення 79, причому введення здійснюється протягом періоду шість місяців або більше, в одному варіанті здійснення 8 місяців або більше, в одному варіанті здійснення 9 місяців або більше до заправлення порт-пристрою доставлення.

81. Будь-який із варіантів здійснення 1-60 або фармацевтичний склад за варіантом здійснення 69 для використання як лікарського засобу шляхом введення антитіла або фармацевтичного складу за допомогою порт-пристрою доставлення, причому антитіло вводять у порт-пристрій доставлення за концентрації 150 мг /мл або більше, в одному варіанті здійснення за концентрації 200 мг/мл або більше.

ОПИС АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1	Домен VH P1AA8906 DFQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASYEFYDDMSWVR QAPGKGLEWVGSISPKGGSTYYNTKFIGRFTISRDN SKN
-------------	---

	TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGFFDMWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO:2	Домен VL P1AA8906 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLSNYLAWYQ QKPGKAPKLLIFDARWLHGVPSRFSGSGSHEDYTLTIS SLQPEDFATYYCQQYRYHPYTFGHGKVEIK
SEQ ID NO:3	H-CDR1 P1AA8906, P1AA0902 та P1AD9820 DDMS
SEQ ID NO:4	H-CDR2 P1AA8906 SISPKGGSTYYNTKFIG
SEQ ID NO:5	H-CDR3 P1AA8906 DVGFFDM
SEQ ID NO:6	L-CDR1 P1AA8906 HGSYWLSNYLA
SEQ ID NO:7	L-CDR2 P1AA8906 DARWLH
SEQ ID NO:8	L-CDR3 P1AA8906, P1AA0902 та P1AD9820 QQYRYHPYT
SEQ ID NO:9	Важкий ланцюг Fab-фрагмента P1AA8906 DFQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASYEFYDDMSWVR QAPGKGLEWVGSISPKGGSTYYNTKFIGRFTISRDNKSN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGFFDMWGQGTTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
SEQ ID NO:10	Легкий ланцюг Fab-фрагмента P1AA8906 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLSNYLAWYQ QKPGKAPKLLIFDARWLHGVPSRFSGSGSHEDYTLTIS SLQPEDFATYYCQQYRYHPYTFGHGKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:11	Домен VH P1AA0902 DDHLVESGGGLVKPGGSLRLSCATADFFEYDDMSWVR QAPGKGLEWVGSISGRGDHKYLNKFIGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGFFDWWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO:12	Домен VL P1AA0902 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLNSELAWYQQ KPGKAPKLLIFDGDGDFKVDVPSRFSGSGSHEDYTLTISSL QPEDFATYYCQQYRYHPYTFGHGKVEIK
SEQ ID NO:13	H-CDR2 P1AA0902 SISGRGDHKYLNKFIG
SEQ ID NO:14	H-CDR3 P1AA0902 та P1AD9820 DVGFFDW
SEQ ID NO:15	L-CDR1 P1AA0902 HGSYWLNSELA
SEQ ID NO:16	L-CDR2 P1AA0902 DGDGDFKVF
SEQ ID NO:17	Важкий ланцюг Fab-фрагмента P1AA0902 DDHLVESGGGLVKPGGSLRLSCATADFFEYDDMSWVR QAPGKGLEWVGSISGRGDHKYLNKFIGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGFFDWWGQGTTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGKTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
SEQ ID NO:18	Легкий ланцюг Fab-фрагмента P1AA0902 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLNSELAWYQQ KPGKAPKLLIFDGDGDFKVDVPSRFSGSGSHEDYTLTISSL QPEDFATYYCQQYRYHPYTFGHGKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:19	Домен VH P1AD9820 SEHLVESGGGLVKPGGSLRLSCATADFFEYDDMSWVR QAPGKGLEWVGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGFFDWWGQGLTV TVSS
SEQ ID NO:20	Домен VL P1AD9820 AIYMHQEPSSLSASVGDRVITICHGSYWLNSEVAWYQ QKPGKAPKLLIFDGDGFKVYEVPSRFSGSGSHEDYTLTIS SLQPEDFATYYCQQYRYHPYTFGHGTVKVEIK
SEQ ID NO:21	H-CDR2 P1AD9820 SISPKGDHKYLNTKFIG
SEQ ID NO:22	L-CDR1 P1AD9820 HGSYWLNSEVA
SEQ ID NO:23	L-CDR2 P1AD9820 DGDFKVY
SEQ ID NO:24	Важкий ланцюг Fab-фрагмента P1AD9820 SEHLVESGGGLVKPGGSLRLSCATADFFEYDDMSWVR QAPGKGLEWVGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGFFDWWGQGLTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
SEQ ID NO:25	Легкий ланцюг Fab-фрагмента P1AD9820 AIYMHQEPSSLSASVGDRVITICHGSYWLNSEVAWYQ QKPGKAPKLLIFDGDGFKVYEVPSRFSGSGSHEDYTLTIS SLQPEDFATYYCQQYRYHPYTFGHGTVKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPRKAKVQWVKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:26	VEGF людини MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQN HHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKP SCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQ GQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKSVRGKKGK QKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCCLMPWVSLPGPHPCGPC SERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTC RCDKPRR
SEQ ID NO:27	ANG2 людини MWQIVFFTLSCDLVLAAYNNFRKSMDSIGKKQYQVQ HGSCSYTFLLPEMDNCRSSSPYVSNVQRDAPLEYDD SVQRLQVLENIMENNTQWLMKLENYIQDNMKKEMVEI QQNAVQNQTAVMIEIGTNLLNQTAEQTRKLTDEAQV LNQTTRLELQLEHSLSTNKLEKQILDQTSEINKLQDKN SFLEKKVLAMEDKHIIQLQSIKEEKDQLQVLVSKQNSII EELEKKIVTATVNNSVLQKQHDLMETVNNLLTMMST SNSAKDPTVAKEEQISFRDCAEVFKSGHTTNGIYTLTFP NSTEEIKAYCDMEAGGGGWIIQRREDGSVDFQRTWK EYKVGFGNPSGEYWLGNFVSQLTNQRYVLKIHLKD WEGNEAYSLYEHFYLSEELNYRIHLKGLTGTAGKISSI SQPGNDFSTKGDNDKCICKCSQMLTGGWWFDACGPS NLNGMYYPQRQNTNKFNGIKWYYWKGSGYSLKATTM MIRPADE
SEQ ID NO:28	VEGFA-121 людини MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQN HHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKP SCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQ GQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKCDKPRR
SEQ ID NO:29	Несвакумаб LC IVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQHYDNSQTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF

	PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
SEQ ID NO:30	Несвакумаб НС AVQLVASGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDIHWVR QATGKGLEWVSAIGPAGDTYYPGSVKGRFTISRENAKN SLYLQMNSLRAGDTAVYYCARGLITFGGLIAPFDYWG QGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ПРИКЛАДИ

Наступні приклади представлені для допомоги у розумінні цього винаходу, справжній об'єм якого вказаний у доданій формулі винаходу. Слід розуміти, що у викладених процедурах можна здійснювати модифікації, не відступаючи від суті винаходу.

Матеріали та загальні способи

Афінність VEGF-A121 людини в Kinexa.

- Інструменти та матеріали.

Використовували прилад KinExA 3200 від Sapidyne Instruments (Boise, ID) з автоматичним пробовідбірником. Гранули з поліметилметакрилату (PMMA) були придбані у Sapidyne, антитіла до VEGF були придбані в R&D Systems (Mab293, BAF293). Кон'югат Streptavidin Alexa Fluor™ 647 був придбаний у Thermo Fisher science (S21374). ФCB (фосфатно-сольовий буфер), BCA (фракція V бічачого сироваткового альбуміну), VEGFA-121 (SEQ ID NO: 28) отримували в компанії (Roche).

- Отримання кульок, покритих антигеном

На гранули PMMA було нанесено покриття згідно з протоколом довідника KinExA (адсорбційне покриття, Sapidyne). Спочатку 30 мкг антитіла до VEGF MAB293 (R&D) в 1 мл ФCB (pH 7,4) додавали на флакон (200 мг) кульок для адсорбційного покриття. Після обертання протягом 2 год. за кімнатної температури супернатант видаляли та доповнювали 1 мл блокувального розчину (10 мг/мл BCA в буфері) і струшували протягом 1 год.

- KinExA аналіз рівноваги

Всі експерименти KinExA проводились за кімнатної температури (КТ) із застосуванням ФCB за pH 7,4 з 0,01 % BCA та 0,01 % Твін20 (BioRad, №161-0781) як робочого буфера. Зразки та кульки отримували в буфері LowCross (Candor Bioscience), щоб зменшити неспецифічне зв'язування, яке спостерігалось в попередніх вимірюваннях. Використовувалась швидкість потоку 0,25 мл/хв. Постійну кількість VEGFA-121-His (50 пМ і в другому експерименті 500 пМ) титрували досліджуваним антитілом шляхом дворазового серійного розведення, починаючи з 4 нМ (діапазон концентрацій 1,95 пМ – 4000 пМ). Комплекси антиген-антитіло інкубували за КТ протягом щонайменше 8 годин для досягнення рівноваги. Потім урівноважені суміші пропускали через колонку з кульками антитіла до VEGF (Mab293) у системі KinExA об'ємом 750 мкл для 50 пМ постійного VEGF та об'ємом 125 мкл для 500 пМ постійного VEGF, що давало змогу захопити кульками незв'язаний VEGFA-121, не порушуючи рівноважний стан розчину. Зв'язаний VEGFA-121 був виявлений за допомогою другого біотинільованого антитіла до VEGF (BAF293) з концентрацією 250 нг/мл і з наступною ін'єкцією 250 нг/мл кон'югату Streptavidin Alexa Fluor™ 647 у буфер для зразків. Кожен зразок вимірювався у двох примірниках для всіх рівноважних експериментів. К_D отримували в нелінійному регресійному аналізі даних з використанням моделі гомогенного зв'язування на одній ділянці, яка міститься в програмному забезпеченні KinExA (версія 4.0.11) за допомогою методу "стандартного аналізу". Програмне забезпечення розраховує К_D і визначає 95 % довірчий інтервал, підганяючи точки даних до теоретичної кривої К_D. 95 % довірчий інтервал задається як низька К_D і висока К_D.

Для остаточного визначення К_D було проведено визначення n-кривої двох вимірювань з різними постійними концентраціями VEGFA-121. Аналіз n-кривої можна використовувати для аналізу кількох стандартних експериментів з К_D на одній осі, щоб отримати більш точне визначення К_D.

Афінність ANG2 людини в Kinexa.

• Інструменти та матеріали

Використовували прилад KinExA 3200 від Sapidyne Instruments (Boise, ID) з автоматичним

пробовідбірником. Гранули з поліметилметакрилату (PMMA) були придбані у Sapidyne, антитіла до Ang2 були придбані в R&D Systems (MAB098, BAM0981). Кон'югат Streptavidin Alexa Fluor™ 647 був придбаний у Thermo Fisher science (S21374). ФСБ (фосфатно-сольовий буфер), БСА (фракція V бичачого сироваткового альбуміну), Ang2 (SEQ ID NO: 27) отримували в компанії (Roche).

- Отримання кульок, покритих антигеном

На гранули PMMA було нанесено покриття згідно з протоколом довідника KinExA (адсорбційне покриття, Sapidyne). Спочатку 20 мкг антитіла до Ang2 MAB098 (R&D) в 1 мл ФСБ (pH 7,4) додавали на флакон (200 мг) кульок для адсорбційного покриття. Після обертання протягом 2 год. за кімнатної температури супернатант видаляли та доповнювали 1 мл блокувального розчину (10 мг/мл БСА в буфері) і струшували протягом 1 год.

- KinExA аналіз рівноваги

Всі експерименти KinExA проводились за кімнатної температури (КТ) із застосуванням ФСБ за pH 7,4 з 0,01 % БСА та 0,01 % Твін20 (BioRad, №161-0781) як робочого буфера. Зразки та кульки отримували в буфері LowCross (Candor Bioscience), щоб зменшити неспецифічне зв'язування, яке спостерігалось в попередніх вимірюваннях. Використовувалась швидкість потоку 0,25 мл/хв. Постійну кількість Ang2-RBD- μ Fc (50 пМ і в другому експерименті 500 пМ) титрували досліджуванним антитілом шляхом дворазового серійного розведення, починаючи з 4 нМ (діапазон концентрацій 1,95 пМ – 4000 пМ). Комплекси антиген-антитіло інкубували за КТ протягом щонайменше 8 годин для досягнення рівноваги. Потім урівноважені суміші пропускали через колонку з кульками антитіла до Ang2 (MAB098) у системі KinExA в об'ємі 750 мкл для 50 пМ постійного Ang2 та в об'ємі 188 мкл для 500 пМ постійного Ang2, що дає змогу захоплювати кульками незв'язані Ang2, не порушуючи рівноважний стан розчину. Зв'язаний Ang2 виявляли за допомогою другого біотинільованого антитіла до Ang2 (BAM0981) з концентрацією 250 нг/мл і з наступною ін'єкцією 250 нг/мл кон'югату Streptavidin Alexa Fluor™ 647 у буфер для зразків. Кожен зразок вимірювався у двох примірниках для всіх рівноважних експериментів. K_D отримували в нелінійному регресійному аналізі даних з використанням моделі гомогенного зв'язування на одній ділянці, яка міститься в програмному забезпеченні KinExA (версія 4.0.11) за допомогою методу "стандартного аналізу". Програмне забезпечення розраховує K_D і визначає 95 % довірчий інтервал, підганяючи точки даних до теоретичної кривої K_D . 95 % довірчий інтервал задається як низька K_D і висока K_D .

Для остаточного визначення K_D було проведено визначення n-кривої двох вимірювань з різними постійними концентраціями Ang2. Аналіз n-кривої можна використовувати для аналізу кількох стандартних експериментів з K_D на одній осі, щоб отримати більш точне визначення K_D .

Кінетика зв'язування VEGF-A людини, оцінена за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР).

Захватне антитіло до His (GE Healthcare 28995056) іммобілізували на Sensor Chip C1 серії S (GE Healthcare BR100535), використовуючи стандартну хімію амінного зв'язування, що давало щільність поверхні приблизно 600 одиниць резонансу (ОР). Як робочий буфер та буфер для розведення використовували HBS-P+ (10 mM ГЕПЕС, 150 mM NaCl, pH 7,4, 0,05 % сурфактанту P20). VEGF-A121-His людини захоплювався на поверхні з одержанням щільностей лігандів приблизно 10 та 20 ОР, відповідно. Послідовно вводили серійні розведення досліджуваного антитіла (3,7–300 нМ, розведення 1:3) упродовж 60 с кожне, дисоціацію відстежували впродовж 3600 с за швидкості потоку 30 мкл/хв (кінетика одного циклу). Поверхню регенерували шляхом введення 10 mM гліцину з pH 1,5 протягом 60 с зі швидкістю потоку 5 мкл/хв. Об'ємну різницю показника заломлення коригували шляхом віднімання контрольних введень і шляхом віднімання відповіді, одержаної від контрольної проточної комірки без іммобілізованого VEGF-A121 людини. Апроксимацію кривих проводили, використовуючи 1:1 модель зв'язування Ленгмюра в оцінному програмному забезпеченні Biacore.

Кінетика зв'язування VEGF-A, оцінена за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР) для дослідження перехресної реактивності.

Захватне антитіло до His (GE Healthcare 28995056) іммобілізували на Sensor Chip C1 серії S (GE Healthcare BR100535), використовуючи стандартну хімію амінного зв'язування, що давало щільність поверхні приблизно 600 одиниць резонансу (ОР). Як робочий буфер та буфер для розведення використовували HBS-P+ (10 mM ГЕПЕС, 150 mM NaCl, pH 7,4, 0,05 % сурфактанту P20). VEGF-A121-His зазначеного виду захоплювався на поверхні з одержанням щільностей лігандів приблизно 10 та 20 ОР, відповідно. Послідовно вводили серійні розведення досліджуваного антитіла (3,7–300 нМ, розведення 1:3) упродовж 60 с кожне, дисоціацію відстежували впродовж 3600 с за швидкості потоку 30 мкл/хв (кінетика одного циклу). Поверхню регенерували шляхом введення 10 mM гліцину з pH 1,5 протягом 60 с зі швидкістю потоку 5 мкл/хв. Об'ємну різницю показника заломлення коригували шляхом віднімання контрольних введень і шляхом віднімання відповіді, одержаної від контрольної проточної комірки без іммобілізованого VEGF-A121. Апроксимацію кривих проводили, використовуючи 1:1 модель зв'язування Ленгмюра в оцінному програмному забезпеченні Biacore.

Кінетика зв'язування ANG2 людини, оцінена за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР).

Захватне антитіло до Fab (GE Healthcare 28958325) іммобілізували на Sensor Chip C1 серії S (GE Healthcare BR100535), використовуючи стандартну хімію амінного зв'язування, що давало щільність поверхні приблизно 800 одиниць резонансу (ОР). Як робочий буфер та буфер для розведення використовували HBS-P+ (10 мМ ГЕПЕС, 150 мМ NaCl, pH 7,4, 0,05 % поверхнево-активної речовини P20), температура вимірювання становила 25 °С. Досліджуване антитіло було захоплено шляхом ін'єкції 50 нМ розчину протягом 60 с зі швидкістю потоку 5 мкл/хв. Асоціацію вимірювали шляхом введення Ang2-RBD людини у різних концентраціях у розчин впродовж 180 с зі швидкістю потоку 30 мкл/хв, (0,07 нМ - 50 нМ, із розведеннями 1:3). Фазу дисоціації відстежували протягом до 900 с та ініціювали шляхом перемикання з розчину зразка на робочий буфер зі швидкістю потоку 30 мкл/хв. Поверхню відновлювали шляхом введення 10 мМ гліцину, pH 2,1, упродовж 60 с зі швидкістю потоку 30 мкл/хв. Об'ємну різницю показника заломлення коригували шляхом віднімання контрольних введень і шляхом віднімання відповіді, одержаної від еталонної проточної комірки без іммобілізованого досліджуваного антитіла. Апроксимацію кривих проводили, використовуючи 1:1 модель зв'язування Ленгмюра в оцінному програмному забезпеченні Biacore.

Кінетика зв'язування ANG2, оцінена за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР) для дослідження перехресної реактивності.

Захватне антитіло до Fab (GE Healthcare 28958325) іммобілізували на Sensor Chip C1 серії S (GE Healthcare BR100535), використовуючи стандартну хімію амінного зв'язування, що давало щільність поверхні приблизно 800 одиниць резонансу (ОР). Як робочий буфер та буфер для розведення використовували HBS-P+ (10 мМ ГЕПЕС, 150 мМ NaCl, pH 7,4, 0,05 % поверхнево-активної речовини P20), температура вимірювання становила 25 °С. Досліджуване антитіло було захоплено шляхом ін'єкції 50 нМ розчину протягом 60 с зі швидкістю потоку 5 мкл/хв. Асоціацію вимірювали шляхом введення Ang2-RBD зазначених видів за різних концентрацій у розчині протягом 180 с зі швидкістю потоку 30 мкл/хв (0,07 нМ - 50 нМ, розведення 1:3). Фазу дисоціації відстежували протягом до 600 с та ініціювали шляхом перемикання з розчину зразка на робочий буфер зі швидкістю потоку 30 мкл/хв. Поверхню відновлювали шляхом введення 10 мМ гліцину, pH 2,1, упродовж 60 с зі швидкістю потоку 30 мкл/хв. Об'ємну різницю показника заломлення коригували шляхом віднімання контрольних введень і шляхом віднімання відповіді, одержаної від еталонної проточної комірки без іммобілізованого антитіла. Апроксимацію кривих проводили, використовуючи 1:1 модель зв'язування Ленгмюра в оцінному програмному забезпеченні Biacore.

Оцінка незалежного зв'язування з цільовими антигенами за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР)

Близько 5000 одиниць резонансу (ОР) системи захоплення (захватне антитіло до Fab (GE Healthcare 28958325)) з'єднували на чипі CM5 (GE Healthcare BR100530) за pH 5,0 за допомогою набору для зв'язування амінів, наданого GE Healthcare. Зразок та системний буфер являв собою HBS-P+ (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,4, 0,05 % поверхнево-активної речовини P20). Температуру проточної кювети встановлювали на рівні 25 °С, а блоку зразків встановлювали на рівні 12 °С. Перед захопленням проточну кювету тричі заповнювали проточним буфером.

Захоплення біспецифічного Fab проводили за допомогою введення 6,5 мкг/мл розчину впродовж 60 с за швидкості потоку 5 мкл/хв. Незалежне зв'язування кожного ліганду з біспецифічним Fab аналізували шляхом визначення здатності до активного зв'язування для кожного ліганду, доданого послідовно або одночасно (потік 10 мкл/хв).

1) Введення VEGFA-121 людини з концентрацією 1 мкг/мл протягом 60 с (визначає одноразове зв'язування антигену).

2) Введення Ang2 людини з концентрацією 5 мкг/мл протягом 60 с (визначає одноразове зв'язування антигену).

3) Введення VEGFA-121 людини з концентрацією 1 мкг/мл протягом 60 с з наступною додатковою ін'єкцією Ang2 людини з концентрацією 5 мкг/мл протягом 60 с (визначає зв'язування Ang2 у присутності VEGFA-121).

4) Введення Ang2 людини з концентрацією 5 мкг/мл протягом 60 с з наступною додатковою ін'єкцією VEGFA-121 людини з концентрацією 1 мкг/мл протягом 60 с (визначає зв'язування VEGFA-121 у присутності Ang2).

5) Спільне введення VEGFA-121 людини з концентрацією 1 мкг/мл і Ang2 людини з концентрацією 5 мкг/мл протягом 60 секунд (ідентифікує зв'язування VEGFA-121 і Ang2 одночасно).

Поверхню відновлювали шляхом введення 10 мМ гліцину, pH 2,1, упродовж 60 с зі швидкістю потоку 30 мкл/хв. Об'ємну різницю показника заломлення коригували шляхом віднімання контрольних введень і шляхом віднімання відповіді, одержаної від еталонної проточної комірки без іммобілізованого біспецифічного Fab. Біспецифічне антитіло здатне зв'язувати обидва антигени незалежно один від одного, якщо кінцевий сигнал підходів 3, 4 і 5 дорівнює сумі окремих кінцевих сигналів підходів 1 і 2.

Термічна стабільність:

Зразки Fab-фрагмента біспецифічного антитіла отримували в концентрації 1 мг/мл у 20 мМ

гістидину/гістидинхлориду, 140 mM NaCl, pH 6,0 і переносили в масив мікрокувет на 10 мкл. Дані статичного розсіювання світла, а також дані флуоресценції за збудження лазером із довжиною хвилі 266-нм записуються за допомогою приладу UNcle (Unchained Labs), коли зразки нагріваються зі швидкістю 0,1 °C/хв від 30 °C до 90 °C. Зразки вимірювали в трьох примірниках.

Оцінку початкових температур проводили за допомогою програмного забезпечення для аналізу UNcle. Температуру початку агрегації визначали як температуру, за якої інтенсивність розсіяного світла починала підвищуватися. Денатурацію білка контролювали за зсувом барицентричного середнього (BCM) сигналу флуоресценції порівняно з тепловим. Температура плавлення визначають як точку перегину кривої BCM (нм) від температури.

Фізико-хімічна стабільність.

Зразки антитіл складали у 20 mM His/HisCl, 140 mM NaCl, pH 6,0, і ділили на три аліквоти: одну аліквоту повторно буферизували в ФСБ, відповідно, а дві аліквоти зберігали в початковому препараті. Аліквоту в ФСБ і одну аліквоту в His/HisCl інкубували протягом 2 тижнів (2 тижні) за 40 °C (His/NaCl) або 37 °C (ФСБ) в 1 мг/мл, зразок у ФСБ інкубували додатково всього протягом 4 тижнів (4 тижні). Третій зразок контрольної аліквоти зберігали за -80 °C. Після закінчення інкубації зразки аналізували на відносну концентрацію активної речовини (Biacore; концентрація активної речовини обох підданих обробці аліквот кожного зв'язувального нормалізували до не підданої обробці аліквоти за 4 °C), агрегацію (EX) і фрагментування (капілярний електрофорез або ДСН-ПААГ, КЕ-ДСН) і порівнювали з необробленим контролем.

Кінетика зв'язування VEGF-A та ANG2 людини оцінюється за допомогою ППР для дослідження функціональної стабільності

VEGFA-121 (власний), протеїн А (Pierce/Thermo Scientific 21181) і захватне антитіло до Fab людини (GE Healthcare 28958325) були іммобілізовані на різних проточних кюветах на сенсорному чипі Series S CM5 (GE Healthcare 29104988) за допомогою стандартної хімії зв'язування амінів, з одержанням поверхневої щільності 3000 для hVEGFA-121 і протеїну А та 12000 одиниць резонансу (ОР) для захватного антитіла до Fab людини. Як робочий буфер та буфер для розведення використовували HBS-N (10 mM ГЕПЕС, 150 mM NaCl pH 7,4, GE Healthcare). Зразок і робочий буфер для наступних вимірювань концентрації являли собою HBS-P (10 mM ГЕПЕС, 150 mM NaCl, pH 7,4, 0,05 % поверхнево-активної речовини P20; GE Healthcare). Температуру проточних кювет встановлювали на 25 °C, а блоку зразків встановлювали на рівні 12 °C. Перед вимірюванням концентрації проточну кювету двічі заповнювали проточним буфером. Спочатку димер Ang2-RBD-hFc людини був захоплений введенням розчину 10 мкг/мл протягом 120 с зі швидкістю потоку 10 мкл/хв. Досліджувані антитіла вводили в розчин протягом 60 с зі швидкістю потоку 5 мкл/хв у концентрації 1 мкг/мл. Фазу дисоціації відстежували протягом до 30 с й ініціювали шляхом перемикання з розчину зразка на робочий буфер.

Поверхні hVEGFA-121 відновлювали за допомогою 30 с промивання 10 mM розчином гліцину за pH 2,0 зі швидкістю потоку 30 мкл/хв. Поверхні протеїну А відновлювали за допомогою 30 с промивання 10 mM розчином гліцину за pH 1,5 зі швидкістю потоку 30 мкл/хв. Нарешті, поверхні антитіл до Fab людини регенерували 60-секундним промиванням 10 mM розчином гліцину за pH 2,1 зі швидкістю потоку 30 мкл/хв.

Об'ємний показник заломлення коригували шляхом віднімання відповіді, отриманої з пустої поверхні. Для оцінки була взята відповідь зв'язування.

Відносну концентрацію активної речовини розраховували шляхом прив'язування кожного зразка, який піддавався обробці за температури, до відповідного зразка, який не піддавався обробці.

$$\text{відн}_{\text{конц}_{\text{акт}}} \cdot \text{реч} = \frac{\text{відн}'_{\text{зв'яз}} \text{зразок}}{\text{відн}'_{\text{зв'яз}} \text{еталон}}$$

Щоб нормалізувати сигнал зв'язування антигенів, зв'язування hVEGF-A121 і зв'язування Ang2 нормалізували до зв'язування зразка антитіла до Fab.

$$\text{відн}_{\text{конц}_{\text{акт}}} \cdot \text{реч} = c_{\text{норм}} = \frac{\text{відн}_{\text{конц}_{\text{акт}}} \cdot \text{реч} = c_{\text{зразок}} * 100}{(\text{відн}_{\text{конц}_{\text{акт}}} \cdot \text{реч})_{\text{f ab рівень захоплення}}}$$

Приклад 1.

Одержання Fab-фрагмента біспецифічного антитіла до VEGF-A/ANG2

Fab-фрагмент біспецифічного антитіла до VEGF-A/ANG2 одержували шляхом незалежного скринінгу моноспецифічних антитіл, які зв'язуються з VEGF-A та ANG2, та наступного злиття амінокислотних послідовностей у біпаратонній парі HC/LC, яка утворює Fab-фрагмент, що зв'язується з VEGF-A та ANG2, способом, описаним раніше, наприклад, у WO2012/163520.

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

Перша бібліотека була збагачена зв'язувальними речовинами до ANG2 людини, а друга бібліотека була збагачена зв'язувальними речовинами до VEGF-A людини, шляхом пенінгу фагової бібліотеки. Після пенінгу мініпрепарати плазмід одержували для обох збагачених пулів фагемідних векторів. Мініпрепарати засвоювалися рестрикційним ферментом для видалення ділянки, яка кодує усічений білок гена-III, і повторно циркулювалися шляхом зшивання з одержанням пулів експресійних векторів, які кодують розчинні Fab-фрагменти, які були збагачені зв'язувальними речовинами до ANG2 або зв'язувальними речовинами до VEGF-A, відповідно. Ці пули векторів перетворювали на клітини TG1 E.coli, і окремі колонії обирали та культивували для розчинної експресії окремих Fab-клонів на титраційному мікропланшеті. Супернатанти, які містять розчинні Fab-фрагменти, відбирали для зв'язування з ANG2 або VEGF-A, використовуючи стандартні методи ІФА, і клони TG1, які дають специфічні сполучні речовини, піддавали дії препаратів плазмід ДНК і секвенуванню з одержанням пар послідовностей VH та VL, які специфічно зв'язуються або з ANG2, або з VEGF-A, відповідно.

Пару послідовностей VH та VL біспецифічного антитіла до VEGF-A/ANG2 розробляли *in silico* шляхом (1) заміни непридатних залишків VH 52b-65 в послідовності VH специфічного до ANG2 Fab на вибрані залишки VH 52b-65 специфічного до VEGF-A Fab, таким чином заміщаючи залишки CDR-H2, які потенційно є частиною специфічного до VEGF-A паратопу, на важкий ланцюг зв'язувального ANG2, та (2) заміни непридатних залишків VL 49-57 в послідовності VL специфічного до VEGF-A Fab на вибрані залишки VL 49-57 специфічного до ANG2 Fab, таким чином заміщаючи залишки CDR-L2, які є потенційно частиною специфічного до ANG2 паратопу, на легкий ланцюг зв'язувального VEGF-A.

Приклад 2.

Експресія Fab-фрагмента біспецифічного антитіла P1AA8906 до VEGF-A/ANG2

Одержану розроблену пару послідовностей VH та VL біспецифічного антитіла до VEGF-A/ANG2 синтезували та клонували в експресійному векторі E.coli в рамці з генними послідовностями, які кодують домени CH1 та Скаппа. Вектор перетворювався в клітини TG1 E.coli, і окрему колонію культивували для розчинної експресії Fab-фрагмента біспецифічного антитіла. Біспецифічне антитіло очищали від супернатанта культури TG1 шляхом афінної хроматографії, і перевіряли специфічне зв'язування як з ANG2, так і VEGF-A.

Біспецифічне антитіло "P1AA8906" до VEGF-A/ANG2 обирали, і воно характеризувалося важким ланцюгом SEQ ID NO:9 і легким ланцюгом SEQ ID NO:10.

Для подальших аналізів антитіла до VEGF-A/ANG2 за цим винаходом перетворювали та експресували з клітин CHO стандартними рекомбінантними способами.

Приклад 3.

Визначення характеристик Fab-фрагмента біспецифічного антитіла P1AA8906 до VEGF-A/ANG2

Афінність зв'язування біспецифічного антитіла P1AA8906 оцінювали за допомогою ППР і KinExA, як описано вище в розділі "Матеріали та загальні методи".

Таблиця 1

Зв'язування VEGFA-121 людини

KinExA				ППР			
K _D	K _D висока	K _D низька	Довірчий інтервал	ka [1/Мс]	kd [1/с]	t1/2 [хв]	K _D [пМ]
10,86 пМ	47,94 пМ	<39,23 пМ	95 %	1.66E+06	(4.53E-06)*	2551	(3)*

* за межами опису Biacore®

Аналіз KinExA проводився за таких умов: концентрація VEGF-A-121: 100 пМ / 1000 пМ (CBP), P1AA8906 4 нМ – 0 пМ (розведення 1:2, 12x), час попередньої інкубації ~8 год. за КТ.

Таблиця 2

Зв'язування ANG2 людини

KinExA				ППР			
K _D	K _D висока	K _D низька	Довірчий інтервал	ka [1/Мс]	kd [1/с]	t1/2 [хв]	K _D [пМ]
7,18 нМ	12,67 нМ	<3,45 нМ	95 %	7.03E+06	3.20E-02	0,4	4554

Аналіз KinExA проводився за таких умов: концентрація VEGF-A-121: 100 пМ / 1000 пМ (СВР), Р1АА8906 4 нМ – 0 пМ (розведення 1:2, 12х), час попередньої інкубації ~8 год. за КТ.

Термічну стабільність біспецифічного антитіла Р1АА8906 оцінювали, як описано вище в розділі "Матеріали та загальні методи".

Таблиця 3

Термічна стабільність

Тар. (°C)	Тпл. (°C) DLS
73,7	85,7

Фізико-хімічну стабільність біспецифічного антитіла Р1АА8906 оцінювали, як описано вище в розділі "Матеріали та загальні методи".

Таблиця 4

Фізико-хімічна стабільність (EX)

	T0 (His/NaCl)	2 тижні 40 °C (His/NaCl)	T0 (ФСБ)	2 тижні 37 °C (ФСБ)	4 тижні 37 °C (ФСБ)
Мономер [%]	97,2	96,9	97,5	95,3	92,6
ВМС [%]	2,8	3,1	2,5	4,7	7,4

Таблиця 5

Фізико-хімічна стабільність (KE-ДСН)

	T0 (His/NaCl)	2 тижні 40 °C (His/NaCl)	T0 (ФСБ)	2 тижні 37 °C (ФСБ)	4 тижні 37 °C (ФСБ)
Мономер [%]	98,5	97,9	95,6	94,8	93,0
ВМС [%]	1,5	2,1	4,4	5,2	7,0

Приклад 4.

Покращення Fab-фрагмента біспецифічного антитіла Р1АА8906 до VEGF-A/ANG2

Як показано вище, Р1АА8906, демонструючи високу термічну стабільність і вигідну спорідненість до VEGF-A, демонструє спорідненість до ANG2 у наномолярному діапазоні, а також схильність до утворення домішок з високою молекулярною масою, яка зростає під впливом стресу. Для лікування судинних захворювань очей, які потребують ін'єкції терапевтичного засобу в око, бажано забезпечувати терапевтичний засіб з високою афінністю до цільового антигену та в дуже високих концентраціях для збільшення тривалості терапевтичного ефекту і для мінімізації незручностей для пацієнта. Тому для передбачуваної мети бажано збільшити спорідненість і поліпшити фізико-хімічну стабільність.

Відповідно, для клінічного застосування антитіло потребувало додаткового покращення, наприклад, відносно зв'язування з ANG2 (зокрема, шляхом збільшення швидкості дисоціації) і зниження чутливості до стресу. Декілька циклів дозрівання проводили шляхом введення окремих амінокислотних замін в домен VH та VL. При дозріваннях кандидатні антитіла, одержані з антитіла Р1АА8906, обирали та відбирали на основі їх бажаних властивостей відносно виходу, афінності, одночасного зв'язування з антигеном, гідрофільності, стабільності, в'язкості та інших параметрів.

Покращене кандидатне антитіло Р1АА0902 обирали з багатьох досліджених молекул кандидатних антитіл. Починаючи з цієї молекули, було проведено подальші раунди оптимізації, знову ж таки шляхом введення різних амінокислотних замін у домені VH та VL. Вибір кандидата базувався на його бажаних властивостях, зокрема на покращенні зв'язування ANG2 і забезпеченні введення у шприц у високих концентраціях, зберігаючи інші переважні характеристики, наприклад, спорідненість до VEGF-

А, одночасне зв'язування антигену та термостабільність.

Подальше вдосконалене антитіло-кандидат P1AD9820 було обрано з безлічі досліджених молекул кандидатних антитіл.

Таблиця 6

Амінокислотні послідовності Fab-фрагментів біспецифічних антитіл P1AA8906, P1AA0902, P1AD9820 (числа стосуються SEQ ID NO під час використання в цьому документі)

	VH	VL	важкий ланцюг	легкий ланцюг
P1AA8906	1	2	9	10
P1AA0902	11	12	17	18
P1AD9820	19	20	24	25

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

Кандидатні антитіла експресували, як описано в прикладі 2.

Приклад 5.

Кінетика зв'язування з антигеном покращених Fab-фрагментів біспецифічного антитіла до VEGF-A/ANG2

Кінетику зв'язування з VEGF-A людини та ANG2 людини для кандидатних антитіл оцінювали, як описано вище, з використанням вказаних Fab-фрагментів (амінокислотна послідовність, як показано в Таблиці 4). Для порівняння кінетики зв'язування антигену антитіл за винаходом з молекулами попереднього рівня техніки фаріцімаб (МНН, раніше також згадуваний як RG7716), зв'язувальні речовини VEGF афліберцепта (МНН) і бролюцизумаба (МНН) і зв'язувальні речовини ANG2 несвакумаба (МНН), згадані вище антитіла попереднього рівня техніки, були отримані шляхом рекомбінантної експресії ідентичних амінокислотних послідовностей, розкритих у відповідному МНН. Еталонні молекули в цьому документі також називаються "аналогами", щоб підкреслити, що вони були виготовлені в компанії.

Таблиця 7

Зв'язування VEGFA-121 людини (KinExA)

	K _D	K _D висока	K _D низька	Довірчий інтервал
P1AA8906	10,86 пМ	47,94 пМ	<39,23 пМ	95 %
P1AA0902	11,41 пМ	32,81 пМ	<295,81 пМ	95 %
P1AD9820	3,85 пМ	11,22 пМ	<175,67 пМ	95 %

Таблиця 8

Зв'язування VEGFA-121 людини (ППР)

	k _a [1/Мс]	k _d [1/с]	t _{1/2} [хв]	K _D [пМ]
P1AA8906	1.66E+06	(4.53E-06)*	2551	(3)*
P1AA0902	7.37E+05	(8.27E-06)*	1396	(11)*
P1AD9820	7.27E+05	(5.82E+06)*	1986	(8)*

* за межами опису Biacore®

Таблиця 9

Зв'язування VEGF-A людини (K_D, що вимірюється за допомогою KinExA)

Молекула	VEGFA-121	VEGFA-165
P1AD9820	~4 пМ	~2 пМ
Фаріцімаб (RG7716)	169 пМ	224 пМ
Аналог афліберцепта	0,2 пМ	0,1 пМ
Аналог бролуцизумабу	2 пМ	1 пМ

Таблиця 10

Зв'язування ANG2 людини (KinExA)

	K _D	K _D висока	K _D низька	Довірчий інтервал
P1AA8906	7,18 нМ	12,67 нМ	<3,45 нМ	95 %
P1AA0902	2,75 пМ	14,23 пМ	<9,92 пМ	95 %
P1AD9820	1,72 пМ	6,55 пМ	<6,22 пМ	95 %

Таблиця 11

Зв'язування ANG2 людини (ППР)

	ka [1/Мс]	kd [1/с]	t1/2 [хв]	K _D [пМ]
P1AA8906	7.03E+06	3.20E-02	0,4	4554
P1AA0902	5.51E+06	1.06E-04	109	19
P1AD9820	7.43E+06	5.78E-05	200	8

Таблиця 12

Зв'язування ANG2 людини (K_D, що вимірюється за допомогою KinExA)

Молекула	VEGFA-121
P1AD9820	~2 пМ
Фаріцімаб (RG7716)	7 нМ
Аналог несвакумабу	10 пМ

Незалежне зв'язування кандидатних антитіл VEGF-A людини та ANG2 людини аналізували за допомогою ППР, як описано вище в розділі "Матеріали та загальні методи".

Таблиця 13

Незалежне зв'язування з VEGFA-121 людини та ANG2 людини

молекула		Введення 1	Введення 2	Сигнал [%]
P1AA8906	)	VEGFA-121	HBS-P	50
	)	Ang2-RBD	HBS-P	50
	)	VEGFA-121	Ang2-RBD	82
	)	Ang2-RBD	VEGFA-121	91
	)	Суміш (VEGF+Ang2)	HBS-P	100
	)			
P1AA0902	)	VEGFA-121	HBS-P	50
	)	Ang2-RBD	HBS-P	50

	)			
	)	VEGFA-121	Ang2-RBD	85
	)	Ang2-RBD	VEGFA-121	90
	)	Суміш (VEGF+Ang2)	HBS-P	102
P1AD9820	)	VEGFA-121	HBS-P	50
	)	Ang2-RBD	HBS-P	50
	)	VEGFA-121	Ang2-RBD	85
	)	Ang2-RBD	VEGFA-121	92
	)	Суміш (VEGF+Ang2)	HBS-P	104

Перехресну реактивність VEGF-A та ANG2 інших видів оцінювали, як описано вище в розділі "Матеріали та загальні методи".

Таблиця 14

Оцінка перехресної реактивності Fab-фрагмента P1AD9820 з VEGF-A інших видів

	k_a [1/Mc]	k_d [1/c]	$t_{1/2}$ [хв]	K_D^* [пМ]
VEGF-A-121 людини	4.86E+05	2.21E-05	523	45,5
VEGF-A-121 миші	4.97E+05	1.83E-04	63	368,1
VEGF-A-121 кролика	дуже низьке зв'язування			
VEGF-A-121 свині	1.79E+05	4.99E-04	23	2790

* K_D залежить від налаштування аналізу. Вказана K_D є дійсною для налаштування описаного вище дослідження на перехресну реактивність.

Таблиця 15

Оцінка перехресної реактивності Fab-фрагмента P1AD9820 до ANG2 інших видів

	k_a [1/Mc]	k_d [1/c]	$t_{1/2}$ [хв]	K_D^* [пМ]
ANG2 людини	1.02E+07	2.64E-05	437	3
ANG2 миші	8.11E+06	7.43E-04	16	92
ANG2 кролика	9.91E+06	5.33E-05	217	5
ANG2 свині	7.82E+06	1.05E-04	110	13
ANG2 яванського макака	9.98E+06	1.56E-05	741	2

* K_D залежить від налаштування аналізу. Вказана K_D є дійсною для налаштування описаного вище дослідження на перехресну реактивність

Приклад 6.

Термічна стабільність покращених Fab-фрагментів антитіла до VEGF-A/ANG2

Термічну стабільність зазначених біспецифічних антитіл оцінювали, як описано вище в розділі "Матеріали та загальні методи" та за тих самих умов, що й у прикладі 3.

Таблиця 16

Термічна стабільність

	Тар. (°C)	Тпл. (°C)
P1AA8906	73,7	85,7
P1AA0902	70,2	83,5
P1AD9820	71,6	81,3
Фаріцімаб (RG7716)	64,7	63,6

Приклад 7.

Біофізичні властивості покращених Fab-фрагментів біспецифічних антитіл до VEGF-A/ANG2 (стабільність)

Фізико-хімічну стабільність зазначених біспецифічних антитіл оцінювали, як описано вище в розділі "Матеріали та загальні методи" та за тих самих умов, що й у прикладі 3.

Таблиця 17

Фізико-хімічна стабільність (EX)

	T0 (His/NaCl)	2 тижні 40 °C (His/NaCl)	4 тижні 40 °C (His/NaCl)	T0 (ФСБ)	2 тижні 37 °C (ФСБ)	4 тижні 37 °C (ФСБ)
P1AA8906						
Мономер [%]	97,2	96,9		97,5	95,3	92,6
BMC [%]	2,8	3,1		2,5	4,7	7,4
P1AA0902						
Мономер [%]	98,80	99,64	99,44	98,80	99,02	98,35
BMC [%]	0,20	0,36	0,56	0,20	0,98	1,65
P1AD9820						
Мономер [%]	99,00	98,17		99,00	97,43	96,90
BMC [%]	1,00	1,83		1,00	2,57	3,10

Приклад 8.

Біофізичні властивості покращених біспецифічних Fab-фрагментів антитіла до VEGF-A/ANG2 (оцінка в'язкості методом динамічного розсіювання світла (DLS))

Фрагменти Fab P1AA0902 і P1AD9820, як описано раніше, експресували в клітинах E.coli стандартними способами.

В'язкість вимірювали за допомогою метода з латексною кулькою DLS, як описано раніше (He F et al.; Anal Biochem. 2010 Apr 1;399(1):141-3). Зокрема, з використанням вказаних матеріалів було дотримано наступний протокол.

Оцінка в'язкості.

Інструменти та матеріали

- Планшет-рідер Wyatt DLS з мікропланшетом Greiner Bio-One
- Стандарти розміру Nanosphere™ серії 3000 (кат. № 3300A Thermofisher)
- Твін20 (Roche, кат. № 11332465001) та силіконова олива, наприклад (Alfa Aesar кат. № A12728)
- УФ-фотометр для визначення концентрації (наприклад, Nanodrop 8000).

Отримання зразка

Зразки антитіл були повторно забуферені та розведені у 20 mM His/HCl, pH 6,0 (буфер) і 0,02 % Твін20 (кінцева концентрація). Додавали гранули з концентрацією 0,03 % твердих речовин. Були отримані принаймні чотири різні концентрації, де можливо, найвища концентрація становила приблизно 200 мг/мл. Як контролі без антитіл були потрібні два порожні зразки: один містив наносферні кульки, ресуспендовані у воді, а інший містив наносферні кульки, ресуспендовані в буфері. Зразки переносили в мікропланшет і кожну лунку покривали силіконовою оливою.

Вимірювання за допомогою планшета-рідера Wyatt DLS

Усі зразки та бланки аналізували за різних температур від 15 до 35 °C з кроком 5 °C. Час збору становив 30 с, а кількість зборів становить 40 на зразок і температуру.

Аналіз даних

Необроблені дані Dapp (уявні радіуси) у нм було показано в огляді шаблону програмного забезпечення (Microsoft Dynamics 7.0 або новішої версії). В'язкість розраховували за формулою ($\eta_{real} = Dapp * \eta_{H2O} / D_{real}$). Dreal - це виміряний розмір кульки в порожньому зразку, який дорівнює розміру кульки (300 нм). Розрахована в'язкість була показана на кривих Excel. За допомогою підгонки кривої Муні (в Excel) можна екстраполювати в'язкість за заданої концентрації. У цьому документі була розрахована максимальна концентрація білка, за якої в'язкість перевищує 20 cP.

Максимальна концентрація зазначених антитіл для досягнення в'язкості 20 сП за 20 °С вказана нижче. Результати також показано на Фіг. 10.

Таблиця 18

В'язкість за способом DLS із кульками. Показана максимально можлива концентрація зазначеного антитіла досягає 20 сП за 20 °С. Fab-фрагменти антитіл експресували в E.coli

Антитіло		Концентрація [мг/мл]
P1AA0902	Fab	166,3
P1AD9820	Fab	195

Результати показують, що антитіла за цим винаходом можна складати у високій концентрації, яка містить в'язкість нижче придатної межі в'язкості для введення за допомогою шприца. Хоча обидва досліджуваних антитіла показали сильну здатність до концентрування, ефект більш очевидний для антитіла P1AD9820.

Відповідно, антитіла за цим винаходом є дуже придатними для застосувань для очей, оскільки вони забезпечують високу молярну дозу в обмеженому об'ємі ін'єкції, що під час об'єднання з високою активністю призводить до високого строку придатності та, відповідно, зниженої частоти дозування, що є бажаним для зниження складностей зі сторони пацієнта.

В іншому наборі експериментів в'язкість P1AD9820, створеного в клітинах CHO згідно зі стандартними рекомбінантними методами, аналізували, як описано вище.

Максимальна концентрація зазначених антитіл для досягнення в'язкості 20 сП за 20 °С вказана нижче. Результати також показано на Фіг. 10.

Таблиця 19

В'язкість за способом DLS із кульками. Показана максимально можлива концентрація зазначеного антитіла досягає 20 сП за 20 °С. Fab-фрагменти антитіл експресували в E.coli

Антитіло		Концентрація [мг/мл]
P1AD9820	E.coli	195
P1AD9820	CHO	223

Приклад 9.

Функціональна стабільність покращених Fab-фрагментів антитіла до VEGF-A/ANG2

Фрагмент Fab P1AD9820 обробляли в різних умовах стресу, як описано вище в розділі "Матеріали та загальні методи" (фізико-хімічна стабільність). Зв'язування антигену отриманих стресових зразків антитіл аналізували, як описано вище (розділ "Матеріали та загальні методи": кінетика зв'язування VEGF-A людини та ANG2 людини оцінена за допомогою ППР для дослідження функціональної стабільності).

Таблиця 20

Зв'язування антигену (ППР) для підданих стресу зразків P1AD9820

Умови стресу	Відносна концентрація активної речовини [%] VEGFA-121	Відносна концентрація активної речовини [%] Ang2
Початковий	100	100
2w@40° pH 6,0	99	100
2w@37° ФСБ	100	101
4w@37° ФСБ	100	102

Приклад 10.

Функціональна характеристика покращених Fab-фрагментів антитіла до VEGF-A/ANG2

Інгібування кандидатних антитіл до ANG2 та VEGF-A оцінювали в клітинних аналізах:

інгібування ANG2: аналіз pTie2

Кандидатні антитіла та відібрані еталонні молекули (аналог несвакумабу, виготовлений в компанії шляхом рекомбінантної експресії відповідно до SEQ ID N:29 і 30) попередньо інкубували в 11 концентраціях у діапазоні від 250 нМ до 0,14 нМ у MEM Alpha-Medium. Потрійне концентроване антитіло до Ang2 в 40 мкл змішували з 40 мкл Ang-2 з потрійною концентрацією c=3,9 мкг/мл та

інкубували протягом 30 хв в клітинному інкубаторі. Потім додавали 40 мкл/лунку клітин Hek293_HOMSA-Tie2-Clone22_B11, суспендованих у середовищі FreeStyle без відбору з щільністю 40000 клітин на лунку, протягом 10 хвилин за КТ. Потім фосфорилування Ang2 зупиняли додаванням холодного буфера для лізису з інгібіторами протеази. Потім антитіло до Tie2, пов'язане з планшетом maxisorp, іммобілізувало Tie2 з клітинного лізату протягом 90 хв за кімнатної температури під час струшування. Після кроку промивання в ФСБ, 0,05 % Твін20, біотинільоване антитіло, специфічне для фосфорильованого Tie2, додавали протягом 1 год. за КТ до кінцевої концентрації 3 мкг/мл. Після трьох етапів промивання до кінцевої концентрації 100 мОд/мл додавали пов'язаний з HRP стрептавідин, що перетворювало POD протягом 30 хвилин за КТ для кінцевої колориметричної оцінки кінцевої точки після зупинки 1М H2SO2 за 405/690 нм за допомогою пристрою для зчитування пластин Tecan Sunrise. Результати наведено нижче та на Фіг. 8.

Таблиця 21

Інгібування ANG2 (IC50, клітинний аналіз)

	IC50 [нМ] n=3
P1AA0902	7
P1AD9820	10
Несвакумаб Mab	6

Інгібування VEGF-A: аналіз гена-репортера (RGA)

Для аналізу 37,5 мкл чотирикратно концентрованого досліджуваного антитіла або еталонної молекули попередньо інкубували з чотирикратно концентрованим 37,5 мкл VEGF-A121 (R&D, с=100 мкг/мл) протягом 15 хв за КТ. Потім суміш додавали до 75 мкл/лунку клітин Hek_NFAT_KDR_Luc з щільністю 40000 клітин/лунку та інкубували протягом 5 год. в клітинному інкубаторі. Нарешті, після додавання 100 мкл реагенту BioGlo на лунку, люмінесценцію оцінювали за допомогою планшета-рідера Infinite Pro (Tecan). Результати наведено нижче та на Фіг. 7.

Таблиця 22

Інгібування VEGF-A (IC50, клітинний аналіз)

	IC50 [нМ] n=4
P1AA0902	1,09
P1AD9820	1,07
Ранібізумаб (МНН)	1,10

Приклад 11.

Блокувальна активність VEGF-A121 і VEGF-A165 (вихідний аналіз VEGF-A)

96-лункові планшети Maxisorp (ThermoScientific №442404) покривали 50 мкл/лунку hVEGFR-1-Fc у 200 мМ NaHCO₃, рН 9,4, у кінцевій концентрації 1 мкг/мл протягом 1 год. за кімнатної температури. Зазначені кандидатні Fab-фрагменти розбавляли до концентрації 409,6 нМ у 280 мкл ФСБТ-1 %БСА. Для дворазового серійного розведення 140 мкл цього розведеного зразка Fab змішували зі 140 мкл ФСБТ-1 % БСА і перемішували 7 разів обережним піпетуванням. Цей етап дворазового розведення повторювався ще 9 разів. Круглодонні 96-лункові планшети попередньо заповнювали 50 мкл/лунку 2 нМ VEGF-A121 або 2 нМ VEGF-A165 у ФСБТ-1 % БСА. 50 мкл розведень Fab додавали до планшетів з VEGF, перемішували 6 разів та інкубували протягом 1,5 години. Згодом планшети Maxisorp промивали 2 рази ФСБТ перед додаванням 200 мкл 2 % МРВБТ з подальшим інкубуванням протягом 45 хвилин за кімнатної температури. Після цього планшет двічі промивали за допомогою ФСБТ. 50 мкл преміксу Fab-VEGF переносили на планшет Maxisorp та інкубували 1,5 години за кімнатної температури. Після цього планшети двічі промивали ФСБТ і додавали 50 мкл антитіла до VEGF-bio (розведення 1:2000 у ФСБТ) і SA-HRP (розведення 1:2000 у ФСБТ) та інкубували протягом 30 хвилин за кімнатної температури. Планшети промивали 6 разів ФСБТ і додавали 50 мкл розчину субстрату ТМВ та інкубували протягом 30 хв за кімнатної температури. Нарешті, додайте 50 мкл 1н сірчаної кислоти, щоб зупинити реакцію, і зчитуйте абсорбцію за 450 нм. Результати наведені на Фіг. 5 та 6.

Приклад 12.

Селективне зв'язування ANG2 над ANG1

Вибірковість Ang-2 порівняно з Ang-1 може бути критичною ознакою безпеки для очей: інгібування Fab ANG1 P1AD9820 оцінювали в клітинному аналізі.

ANG-1 є незначним індуктором життєздатності для HUVEC, вирощених в умовах голодування. Таким чином, життєздатність може бути інгібована антитілом, що нейтралізує ANG-1. Антитіло RO5314196 (раніше LC-08 – Thomas M, Kienast Y, Scheuer W, et al. A novel angiopoietin-2 selective fully human antibody with potent anti-tumoral and anti-angiogenic efficacy and superior side effect profile compared to Pan-Angiopoietin-1/-2 inhibitors. PLoS One. 2013; 8 (2): e54923. doi:10.1371/journal.pone.0054923) пригнічує життєздатність HUVEC шляхом нейтралізації ANG-1 і використовувалося як позитивний контроль для аналізу. Колби для клітинної культури T162 від Corning (кат. № 3151), вкриті AF (Attachment Factor) від Gibco (кат. № S-006-100), використовували для підтримки HUVEC до 5 пасажу. Для аналізу життєздатності HUVEC відокремлювали за допомогою Accutase® з подальшим етапом промивання ФСБ-/- . Після цього клітини висівали в EBM-2 з 0,5 % ФБС на вкриті фібронектином 96-лункові планшети з щільністю клітин 10000 клітин/лунку в 100 мкл. Клітини інкубували протягом ночі за 37 °C в 5 % CO₂. Наступного дня P1AD9820 або позитивний контроль зв'язування Ang-1 RO5314196 розводили в EBM/0,5 % ФБС до 10-кратної робочої концентрації. Початкова концентрація становила 1000 мкг/мл з наступною серією 3-кратних 8-точкових розведень, що закінчується на 457,2 мкг/мл. ANG-1 був встановлений на 20-кратну робочу концентрацію, що відповідає 2400 нг/мл. Далі 10 мкл 10х попередньо розведеного P1AD9820, а згодом 5 мкл 20х розчину ANG-1 додавали до клітин у чотирьох лунках на планшет. У кожен експериментальний день кожну умову виконували в подвійних планшетах. Клітини інкубували за 37 °C з 5 % CO₂ протягом 72 годин. Для аналізу в кожну лунку додавали 11 мкл alamarBlue®, а потім інкубували протягом 4 годин в інкубаторі для культур клітин. Поглинання визначали за 570 нм щодо еталонної довжини хвилі 600 нм.

Для кожного експерименту умови дублювали за допомогою двох планшетів для аналізу, на яких кожну умову виконували в чотирьох повторях. Фоновий сигнал нестимульованих клітин віднімали з експериментальних лунок і розраховували середній сигнал для умов. Рівень 100 % відповіді розраховували для клітин, стимульованих ANG-1 (120 нг/мл) без додаткової обробки, і сигнал від лунок, оброблених антитілами, виражали як відсоток інгібування 100 % відповіді. Для P1AD9820 і RO5314196 відсоток інгібування для кожної обробки антитілом вимірювали в n=4 незалежних експериментах і розраховували середнє значення та стандартну похибку середнього значення. Значення IC₅₀ розраховували із середніх значень для кожної концентрації антитіла за допомогою програмного забезпечення ExcelXLfit (IDBS). Криві концентрація-відповідь були підігнані за допомогою нелінійного регресійного аналізу з використанням 5-параметричної логістичної моделі $A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D)))$, розрахованої відносно базальної та максимальної інгібувальної активності.

Клітинний аналіз не виявив інгібування ANG1, опосередкованого P1AD9820.

Приклад 13.

Структурний аналіз Fab-фрагмента P1AD9820

Структурний аналіз Fab P1AD9820 проводили за допомогою рентгенівської кристалографії наступним чином:

комплексоутворення та очищення потрібного комплексу ангіопоетину 2-RBD-VEGF-A121-P1AD9820. Для утворення комплексу Fab-фрагмент P1AD9820 та VEGF-A121 людини (Peprotech) змішували в молярному відношенні 1,1:1. Після інкубації протягом 45 хвилин за 4 °C додавали ангіопоетин2-RBD у молярному співвідношенні до P1AD9820 1,25:1 з наступними 60 хв за 4 °C. Отриманий потрібний комплекс додатково деглікозилювали PNGaseF (NEB) протягом 13 год. за 37 °C і на завершальній стадії очищали гел'єфільтраційною хроматографією на колонці Superdex200 (16/600). Фракції, що містять потрібний комплекс, об'єднували і концентрували до 3,55 мг/мл.

Кристалізація потрібного ангіопоетину 2-RBD-VEGF-A121-P1AD9820. Початкові випробування кристалізації проводили в установках для дифузії пари сидячої краплі за 21 °C і концентрації білка 14,5 мг/мл. Кристали з'явилися протягом 1 дня з 35 % MPD, 0,1 M Na/K фосфату, pH 6,2. Пластинчасті кристали вирости за тиждень до кінцевого розміру 100 × 80 × 30 мкм. Кристали безпосередньо збирали з планшета для відбору без будь-яких додаткових етапів оптимізації.

Збір даних та визначення структури. Для збору даних кристали миттєво охолоджували за 100K в розчині осаджувача без додаткового кріопротектора. Дані дифракції збирали за довжини хвилі 1,0000 Å за допомогою детектора PILATUS 6M і каналі пучка X10SA Swiss Light Source (Villigen, Швейцарія). Дані обробляли за допомогою XDS (Kabsch, W. Acta Cryst. D66, 133-144 (2010)) і наносили на шкалу SADABS (BRUKER). Кристали належать до просторової групи C2 з вісями комірки a=165,74 Å, b=90,27 Å, c=127,89 Å, β=112,05° і переломлюються для розподілення 2,08Å. Структуру визначали шляхом молекулярної заміни на PHASER (McCoy, A.J, Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. J. Appl. Cryst. 40, 658-674 (2007)) з використанням координат спорідненої внутрішньої структури потрібного комплексу Ang2-VEGF-Fab як моделі пошуку. Програми з комплексу CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4 Acta Cryst. D50, 760-763 (1994)) і Buster (Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O.S., Vonrhein, C., Womack, T.O. (2011). Buster version 2.9.5 Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd) використовували для подальшого уточнення даних. Перегрупування вручну білка, використовуючи

різницю електронної щільності, проводили за допомогою COOT (Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. and Cowtan, K. Acta Cryst D66, 486-501 (2010)). Статистика збору даних і уточнення для обох структур представлені в таблиці 23. Всі графічні уявлення одержували за допомогою PYMOL (DeLano Scientific, Palo Alto, CA, 2002).

Таблиця 23

Збір даних і статистика уточнення структури

Збір даних	
Довжина хвилі (Å)	1,0
Розподілення ¹ (Å)	77,83-2,08 (2,18-2,08)
Просторова група	C2
Елементарна комірка (Å, °)	165,74, 90,27, 127,89, 90,00, 112,05, 90,00
Унікальні відбиття	104942 (13712)
Мультиплетність	3,83 (3,68)
Завершеність (%)	0,99 (0,99)
Середній I/σ (I)	7,22 (0,78)
В-фактор Уільсона	44,64
R-вимір	0,069 (0,780)
CC1/2	0,999 (0,768)
Уточнення	
Розподілення ¹ (Å)	77,83-2,08 (2,13-2,08)
Відбиття, які використовують при уточненні	104910 (7712)
Відбиття, які використовують для R-free	5243 (357)
R-робочий ³	0,218 (0,272)
R-вільний ⁴	0,265 (0,303)
Число атомів	12200
Білкові залишки	1466
RMS-зв'язки (Å)	0,010
RMS-кути (°)	1,13
Переважає ділянка за картою Рамачандрана (%)	95,8
Повні маргінальні залишки за картою Рамачандрана (%)	0,35
Залишки ротамерів (%)	4,07
Clashscore	3,53
Середній В-фактор (Å ²)	68,29
білок	66,34
розчинник	59,07

¹ Значення в інтервалі стосується найвищих комірок розподілення.

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

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

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

Амінокислотні залишки у контакті з відповідними антигенами, VEGF-A та ANG2, були ідентифіковані з кристалічної структури потрійного комплексу ангіопоетину 2-RBD-VEGF-A121-P1AD9820. Ілюстрація положення амінокислотних залишків паратопу в доменах VH та VL зображена на фігурі 2 та фігурі 3.

Амінокислотні залишки, визначені як такі, що приймають участь у зв'язуванні антигену, ідентифіковані в таблиці 24 (для амінокислотних залишків варіабельного домену важкого ланцюга) і таблиці 25 (для амінокислотних залишків варіабельного домену легкого ланцюга). Положення амінокислот представлені згідно з номерами в системі нумерації за Кабатом (таку ж нумерацію використовують на фігурах 2 та 3). Положення амінокислот, які залучені у зв'язування антигену, ідентифіковані за їх положенням за Кабатом у домені VH або VL (див. також нумерацію на фігурі 2 та 3).

Таблиця 24

Амінокислотні залишки варіабельного домену важкого ланцюга, які залучені у зв'язування антигену, як ідентифіковано за аналізом кристалічної структури P1AD9820

VH	VEGF-A	ANG2
FR1	-	H3, D26, F27, E29, Y30
H-CDR1	D35c	D35b
FR2	-	-
H-CDR2	D55, H56, K57, Y58, T61, K62, F63, I64, G65	-
FR3	R66	R94
H-CDR3	D95	V96, F98, F99
FR4	-	-

Таблиця 25

Амінокислотні залишки варіабельного домену легкого ланцюга, які залучені у зв'язування антигену, як ідентифіковано за аналізом кристалічної структури P1AD9820

VL	VEGF-A	ANG2
FR1	I2, Y3	-
L-CDR1	Y27, W27a, E32	E32,
FR2	-	L46, F49
L-CDR2	-	D50, F53, K54, V55, Y56
FR3	-	E57
L-CDR3	R92, Y93, H94, P95	Y91
FR4	-	-

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
Hoffmann-La Roche Inc.

<120> Антитіло, яке зв'язується з VEGF-A та ANG2, і способи застосування

<130> P36370

<150> EP20194610.0

<151> 2020-09-04

<150> EP20209591.5

<151> 2020-11-24

<160> 30

<170> PatentIn, версія 3.5

<210> 1

<211> 115

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Домен VH P1AA8906

<400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Tyr Glu Phe Glu Tyr Asp Asp
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Val Gly Phe Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 107

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Домен VL P1AA8906

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H-CDR1 P1AA8906, P1AA0902 та P1AD9820

<400> 3

Asp Asp Met Ser

1

<210> 4

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H-CDR2 P1AA8906

<400> 4

Ser Ile Ser Pro Lys Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Thr Lys Phe Ile

1

5

10

15

Gly

<210> 5

<211> 7

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H-CDR3 P1AA8906

<400> 5

Asp Val Gly Phe Phe Asp Met

1

5

<210> 6

<211> 11

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> L-CDR1 P1AA8906

<400> 6

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

<210> 7
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> L-CDR2 P1AA8906

<400> 7

Asp Ala Arg Trp Leu Val His
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> L-CDR3 P1AA8906, P1AA0902 та P1AD9820

<400> 8

Gln Gln Tyr Arg Tyr His Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 223

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг Fab-фрагменту P1AA8906

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Tyr Glu Phe Glu Tyr Asp Asp
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Val Gly Phe Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 214

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Легкий ланцюг Fab-фрагменту P1AA8906

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

<210> 11
<211> 115
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Домен VH P1AA0902

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ala Asp Phe Phe Glu Tyr Asp Asp
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Val Gly Phe Phe Asp Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser

<210> 12
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Домен VL P1AA0902

<400> 12

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

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

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

Phe Asp Gly Asp Phe Lys Val Phe Asp Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 13

<211> 17
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> H-CDR2 P1AA0902

<400> 13

Ser Ile Ser Gly Arg Gly Asp His Lys Tyr Leu Asn Thr Lys Phe Ile
1 5 10 15

Gly

<210> 14
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> H-CDR3 P1AA0902 та P1AD9820

<400> 14

Asp Val Gly Phe Phe Asp Trp
1 5

<210> 15
<211> 11
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> L-CDR1 P1AA0902

<400> 15

His Gly Ser Tyr Trp Leu Asn Ser Glu Leu Ala

1 5 10

<210> 16
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> L-CDR2 P1AA0902

<400> 16

Asp Gly Asp Phe Lys Val Phe
1 5

<210> 17
<211> 223
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Важкий ланцюг Fab-фрагменту P1AA0902

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ala Asp Phe Phe Glu Tyr Asp Asp
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Val Gly Phe Phe Asp Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18

<211> 214

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Легкий ланцюг Fab-фрагменту P1AA0902

<400> 18

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

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

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

Phe Asp Gly Asp Phe Lys Val Phe Asp Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

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

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

130

135

140

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 19

<211> 115

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Домен VH P1AD9820

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ala Asp Phe Phe Glu Tyr Asp Asp
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Val Gly Phe Phe Asp Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 107
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Домен VL P1AD9820

<400> 20

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

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

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

Phe Asp Gly Asp Phe Lys Val Tyr Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 21
<211> 17
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> H-CDR2 P1AD9820

<400> 21

Ser Ile Ser Pro Lys Gly Asp His Lys Tyr Leu Asn Thr Lys Phe Ile
1 5 10 15

Gly

<210> 22
<211> 11
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> L-CDR1 P1AD9820

<400> 22

His Gly Ser Tyr Trp Leu Asn Ser Glu Val Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> L-CDR2 P1AD9820

<400> 23

Asp Gly Asp Phe Lys Val Tyr

1 5

<210> 24

<211> 223

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг Fab-фрагменту P1AD9820

<400> 24

Ser Glu His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ala Asp Phe Phe Glu Tyr Asp Asp

20 25 30

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

35

40

45

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

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

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

Arg Asp Val Gly Phe Phe Asp Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25

<211> 214

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Легкий ланцюг Fab-фрагменту P1AD9820

<400> 25

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

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

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

Phe Asp Gly Asp Phe Lys Val Tyr Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 26

<211> 232

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly

20

25

30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
225 230

<210> 27
<211> 496
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys
20 25 30

Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro
35 40 45

Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala
50 55 60

Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Asp Ser Val Gln Arg Leu
65 70 75 80

Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys

85

90

95

Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile
100 105 110

Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly
115 120 125

Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp
130 135 140

Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu
145 150 155 160

Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp
165 170 175

Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu
180 185 190

Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser
195 200 205

Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn
210 215 220

Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn
225 230 235 240

Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn
245 250 255

Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr
260 265 270

Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe
275 280 285

Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn
290 295 300

Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly
305 310 315 320

Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln
325 330 335

Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu
340 345 350

Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg
355 360 365

Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr
370 375 380

Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg
385 390 395 400

Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile
405 410 415

Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys
420 425 430

Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp
435 440 445

Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln
450 455 460

Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser
465 470 475 480

Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe
485 490 495

<210> 28
<211> 147
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Arg Arg
145

<210> 29
<211> 213
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> LC Mab Несвакумаба

<400> 29

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

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asp Asn Ser Gln Thr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195

200

205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 30

<211> 452

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HC Mab Несвакумаба

<400> 30

Ala Val Gln Leu Val Ala 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 Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Asp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Ala Ile Gly Pro Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

65

70

75

80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Gly Leu Ile Thr Phe Gly Gly Leu Ile Ala Pro Phe Asp Tyr Trp

100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145	150	155
		160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
	165	170
		175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
	180	185
		190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
210	215	220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala		
225	230	235
		240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
	245	250
		255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
	260	265
		270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

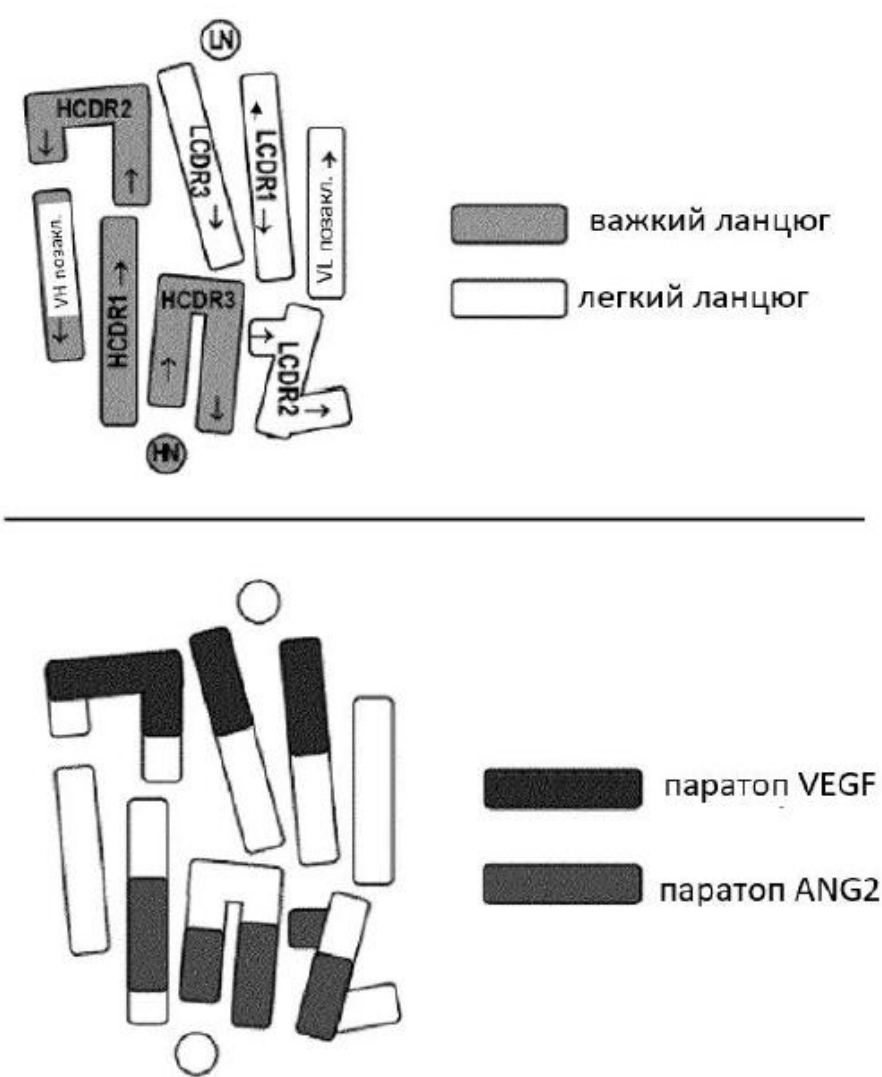
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

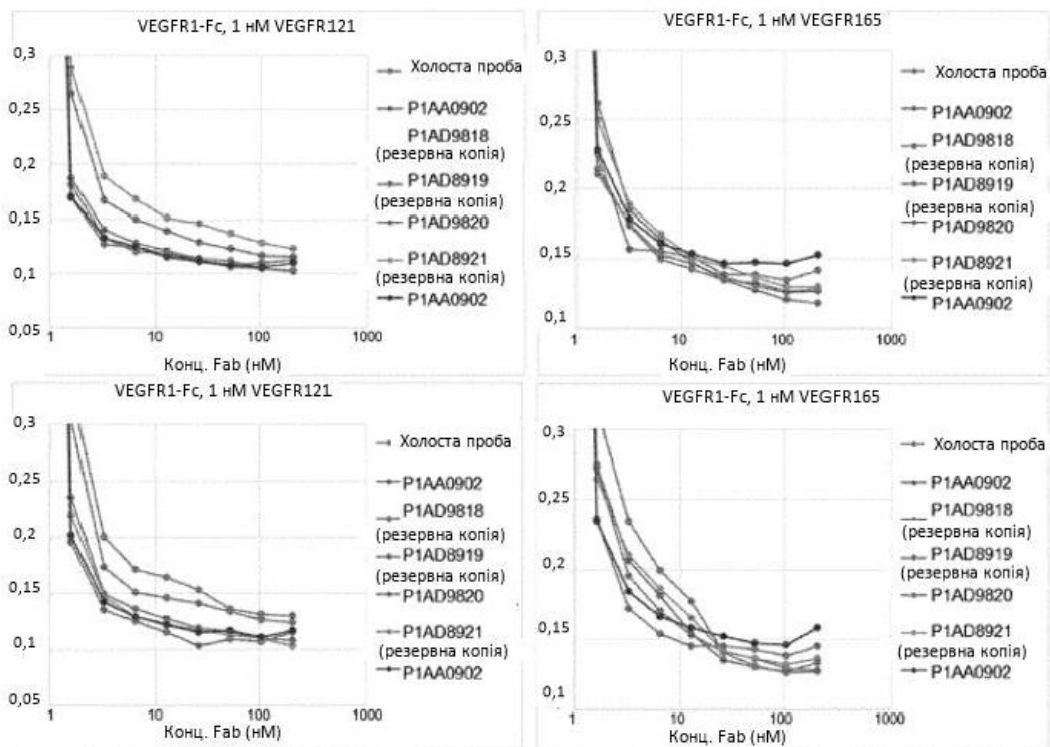
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

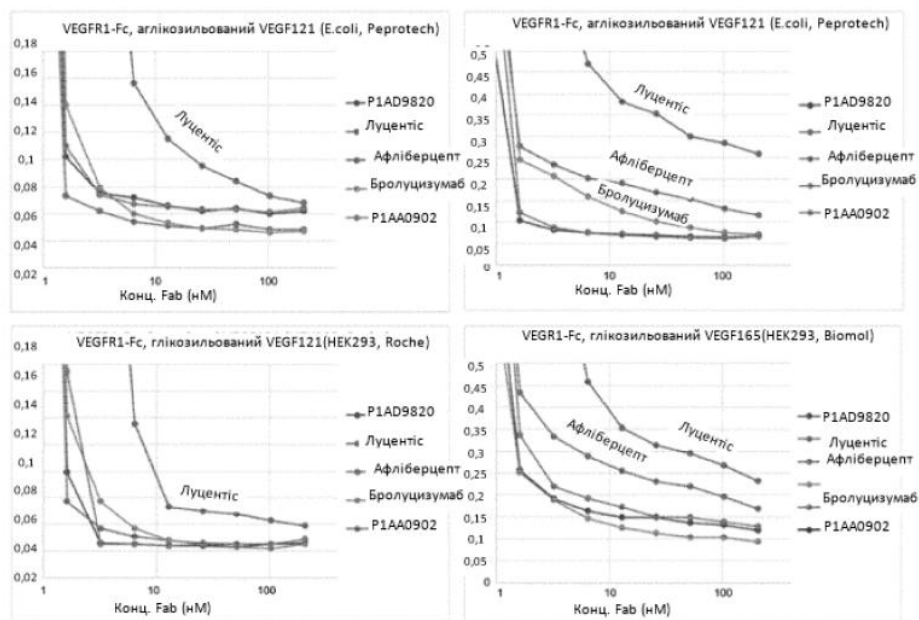
Ser Pro Gly Lys
450



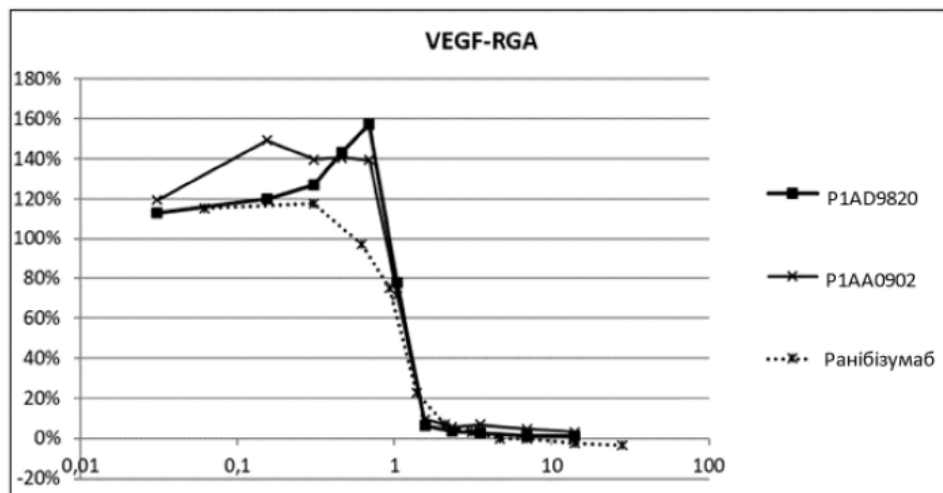
Фиг. 1



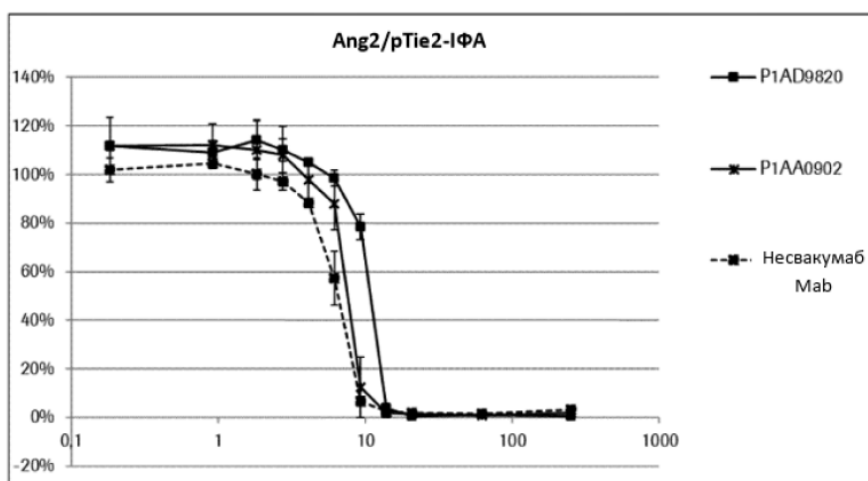
Фіг. 5



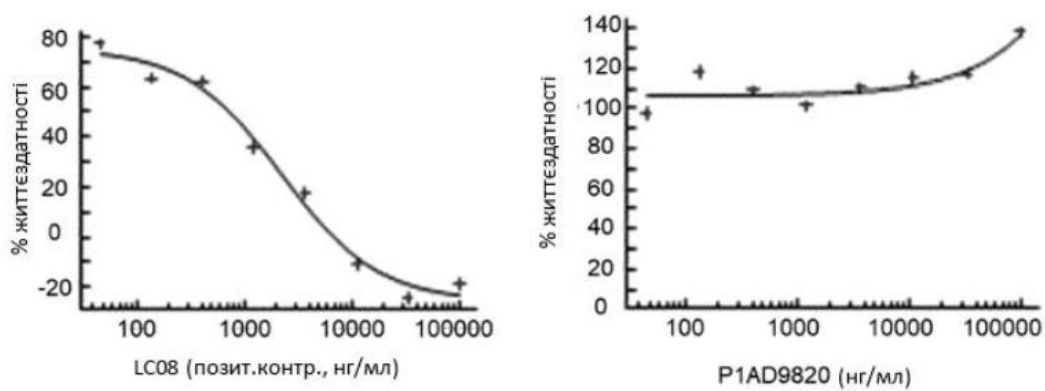
Фіг. 6



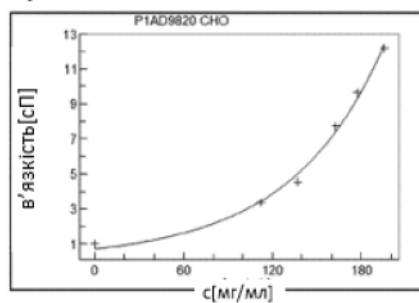
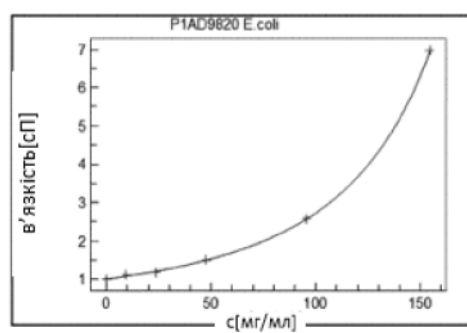
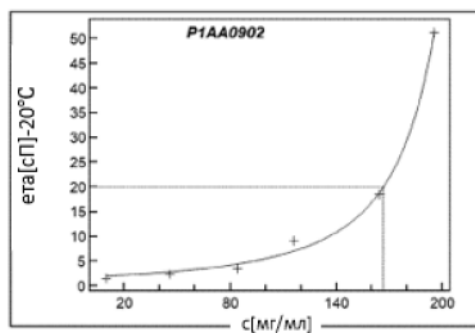
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фіг. 10