

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290620** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.06.24

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.09.24

(54) **АНТИ-NRP1A АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЛАЗ ИЛИ ГЛАЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(31) **19199099.3; 20150942.9**

(32) **2019.09.24; 2020.01.09**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2020/076685**

(87) **WO 2021/058636 2021.04.01**

(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Циппель Нина (DE), Гупта Панкадж,
Хань Фэй, Хуан Инин, Лоу Сара (US),
Престле Йюрген, Томас Лео (DE)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В заявке описывают антитела и их фрагменты, нацеленные на А-домен нейропилина-1 (Nrp1A). Точнее, описывают анти-Nrp1A антитела и способы их применения для лечения различных заболеваний или расстройств.

202290620
A1

202290620

A1

АНТИ-NRP1А АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЛАЗ ИЛИ ГЛАЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

5

Область техники

Настоящее изобретение в основном относится к антителам и их фрагментам, которые нацелены на нейропиплин 1 (Nrp1), точнее, на А-домен Nrp1 (Nrp1A). Точнее, описаны анти-Nrp1А антитела и способы их применения для лечения различных заболеваний или нарушений. Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтические композиции, содержащие анти-Nrp1А антитело.

10

Предшествующий уровень техники

Диабетическая ретинопатия является одним из наиболее тяжелых осложнений сахарного диабета. Несмотря на значительный прогресс в понимании патогенеза этого заболевания и эффективности современных методов лечения, диабетическая ретинопатия остается ведущей причиной впервые возникшей слепоты среди людей трудоспособного возраста.

15

Диабетическая ретинопатия характеризуется прогрессированием нарушений, происходящих на сосудистом, глиальном и нейрональном уровне. Одним из сосудистых осложнений является поражение мелких капиллярных сосудов, приводящее к ишемии сетчатки. Ишемические ретинопатии характеризуются потерей или дисфункцией сосудов сетчатки, что приводит к уменьшению кровотока и гипоксии. Выпадение капилляров часто проявляется вокруг фовеальной аваскулярной зоны (ФАЗ), тем самым увеличивая ее размер, состояние, называемое диабетической макулярной ишемией (ДМИ). Ишемия сетчатки приводит к одновременной активации проангиогенных факторов роста и факторов вазорепульсии, что приводит к неправильному направлению ангиогенеза. Реваскуляризации сетчатки при ишемии не происходит, хотя

наблюдает выраженную патологическую неоваскуляризацию стекловидного тела, то есть области глаза, обычно лишенной кровеносных сосудов. Рост этих аномальных новых сосудов при пролиферативной ретинопатии создает наибольшую угрозу для зрения, поскольку из-за возможной протечки может происходить кровоизлияние или образование рубцов, что в результате могут

20

25

30

закончиться отслойкой сетчатки. Современные методы лечения пролиферативной ретинопатии направлены на разрушение существующих патологических сосудов, но не направлены на лежащую в основе ишемию, которая стимулирует их рост. В настоящее время стандартное лечение пролиферативной ретинопатии включает разрушение части сетчатки лазером в попытке остановить рост новых сосудов и сохранить центральное зрение. Однако эти методы лечения в некоторой степени неэффективны. Хотя некоторые пациенты могут сохранять стабильное зрение в течение многих лет, большой процент пациентов, страдающих ретинопатией, которая в конечном итоге приводит к полной потере зрения.

Ретинопатии также могут характеризоваться повышенной проницаемостью сосудов сетчатки, что приводит к макулярному отеку. В настоящее время пациентов, страдающих диабетическим макулярным отеком, лечат соединениями, нацеленными на фактор роста эндотелия сосудов А (vascular endothelial growth factor А – VEGF-A), фактор роста, который управляет как ангиогенезом, так и проницаемостью сосудов. Эта терапевтическая стратегия может оказаться недостаточной для лечения пациентов, страдающих как макулярной ишемией, так и макулярным отеком.

Таким образом, по-прежнему существует потребность в терапевтическом подходе к лечению пациентов, которым могли бы помочь проангиогенные свойства VEGF-A, в частности пациентам как с макулярной ишемией, так и с макулярным отеком. Следовательно, все еще существует неудовлетворенная потребность в новых терапевтических подходах для эффективного лечения заболеваний глаз или сетчатки.

Краткое описание изобретения

Нейропилины (NRP) представляют собой трансмембранные гликопротеиновые рецепторы, которые играют важную роль в развитии нейронной и сосудистой систем в качестве рецепторов представителей семейства семафоринов класса 3 (SEMA – semaphoring) факторов наведения аксонов и представителей семейства факторов ангиогенеза фактора роста эндотелия сосудов (VEGF – vascular endothelial growth factor). Идентифицированы два белка нейропилина, нейропилин-1 (Nrp-1) и нейропилин-2 (Nrp-2). Их внеклеточная область содержит три домена: два

домена гомологии CUB (А-домен Nrp1, также обозначаемый в настоящем изобретении как «Nrp1A») в качестве лиганд-связывающего домена Sema3, два домена гомологии фактора свертывания крови V/VIII (В-домен Nrp1, также обозначаемый в настоящем изобретении как «Nrp1B») в качестве домена, связывающего VEGF, и домен МAM (с), участвующий в димеризации Nrp-1. Nrp-1 может связывать VEGF-A165, VEGF-B, VEGF-E, PlGF, Sema3A, Sema3B и Sema3C, тогда как Nrp2 связывает VEGF-A165, VEGF-A145, VEGF-C, VEGF-D, SEMA3B, Sema3C, Sema3F и Sema3G. Сайт связывания лигандов VEGF локализован в В-домene Nrp1, тогда как связывание семафоринов локализовано в А-домene Nrp1.

Последовательность Nrp1 человека доступна онлайн, предшественник изоформы А Nrp1 показан в SEQ ID NO: 26 и доступен под названием «Последовательностью эталонного белка NP_003864». Nrp1 изучался в течение многих лет при ангиогенезе и метастазировании опухолей, но его влияние на реваскуляризацию и неоваскуляризацию сетчатки до конца не изучено. В настоящем изобретении установлено, что нацеливание на Nrp1, особенно на А-домен Nrp1, является высокоэффективной стратегией лечения заболеваний глаз и сетчатки.

В настоящем изобретении первый объект относится к анти-Nrp1А антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему:

- переменную область тяжелой цепи, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3);

- переменную область легкой цепи, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Nrp1А антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

- переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%

идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; и

5 - вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17;

10 где:

- вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); и

15 - вариабельная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения
20 предусматривают анти-Ngp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

- вариабельную область тяжелой цепи, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; и

25 - вариабельную область легкой цепи, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Ngp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

30 а. вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11 соответственно;

б. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

5 в. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

г. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

10 д. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

15 е. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

или

ж. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 11, соответственно.

20 В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Ngp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

25 - тяжелую цепь, предпочтительно включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25; и

- легкую цепь, предпочтительно включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-Ngp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему:

30 а. тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

б. тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

5 в. тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

г. тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

10 д. тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

15 е. тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; или

ж. тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

20 В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения анти-Ngp1A антитело представляет собой гуманизованное анти-Ngp1A антитело.

25 В настоящем изобретении второй объект относится к анти-Ngp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают по меньшей мере один аминокислотный остаток в области аминокислот 68-77 Ngp1 как показано в SEQ ID NO: 26.

30 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Ngp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей, указанных в SEQ ID NO: 26. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-Ngp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают аминокислотные области, указанные в SEQ ID NO: 27.

В настоящем изобретении третий объект относится к анти-Nrp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в качестве медикамента.

5 В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Nrp1A антитело или антигенсвязывающий фрагмент для ингибирования вазорепульсивного действия Sema3A и/или для улучшения реваскуляризации сетчатки. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-Nrp1A антителу или антигенсвязывающему фрагменту для ингибирования проницаемости гемато-ретиального барьера (BRB – blood retinal barrier), индуцированного Sema3A, и для ингибирования проницаемости гемато-ретиального барьера, индуцированного VEGF, предпочтительно VEGF-A.

В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Nrp1A антитело или антигенсвязывающий фрагмент для:

- 15 - перенаправления ангиогенеза в области ишемии для улучшения реваскуляризации сетчатки;
- предотвращения патологической неоваскуляризации области стекловидного тела;
- 20 - предотвращения разрушения гемато-ретиального барьера, вызванного Sema3A; и
- предотвращения нарушения гемато-ретиального барьера, вызванного VEGF-A.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к анти-Nrp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в лечении или профилактике заболеваний сетчатки или глаз.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения одного или нескольких заболеваний сетчатки или глаз, включающему введение фармацевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента пациенту, нуждающемуся в этом.

30 В настоящем изобретении четвертый объект относится к анти-Nrp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в лечении или профилактике заболевания, выбранного из группы, состоящей из ретинопатии, пролиферативной ретинопатии (ПР), такой как ретинопатия недоношенных, ишемическая ретинопатия, диабетическая ретинопатия (ДР),

включая пролиферативную диабетическую ретинопатию (ПДР) и непролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетического макулярного отека (ДМО), диабетической макулярной ишемии (ДМИ), возрастной дегенерации желтого пятна, пигментного ретинита, наследственной дистрофии сетчатки, миопической дегенерации, окклюзии вен сетчатки, окклюзии артерии сетчатки, эндофтальмита, увеита, кистозного макулярного отека, хориоидальной неоваскулярной мембраны, вторичной по отношению к любым заболеваниям сетчатки, нейропатий зрительного нерва, глаукомы, отслойки сетчатки, токсической ретинопатии, радиационной ретинопатии, травматической ретинопатии, медикаментозной васкулопатии сетчатки, неоваскуляризации сетчатки, полипозной хориоидальной васкулопатии, васкулита сетчатки, микроаневризма сетчатки, дистрофии Фука, макулярной телеангиэктазии, синдрома Ашера и болезни Старгардта.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-Nrp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в лечении или профилактике заболевания, выбранного из группы, состоящей из диабетической ретинопатии, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, ишемическую ретинопатию, диабетического макулярного отека, диабетической макулярной ишемии, возрастного макулярного отека, неоваскуляризации сетчатки, глаукомы и хориоидальной неоваскуляризации. Предпочтительно указанное заболевание представляет собой диабетический макулярный отек и/или диабетическую макулярную ишемию.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении диабетической макулярной ишемии путем стимуляции регенерации сосудов в сетчатке при ишемии (реваскуляризация) и уменьшения патологической неоваскуляризации области стекловидного тела глаза. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению не ингибирует ангиогенеза, индуцированного VEGF, предпочтительно VEGF-A.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении диабетического

макулярного отека путем снижения, предпочтительно предотвращения, проницаемости гемато-ретиального барьера, индуцированной Sema3A, и путем снижения, предпочтительно предотвращая проницаемость гемато-ретиального барьера, индуцированного VEGF-A.

5 В настоящем изобретении пятый объект относится к фармацевтической композиции, содержащей анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

10 В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Nrp1A антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическую композицию, содержащую анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят парентерально, внутривенно, интравитреально или подкожно, предпочтительно интравитреальным путем.

15 В настоящем изобретении шестой объект относится к выделенному полинуклеотиду или полинуклеотидам, которые включают:

20 - последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, или переменную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; и

- последовательность, кодирующую легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 19, или переменную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 11.

25 В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 or SEQ ID NO: 25, или переменную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; а также
30 последовательность, кодирующую легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 19, или переменную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 11.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают вирусный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую тяжелую

цепь, как показано в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, или переменную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; а также последовательность, кодирующую легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 19, или переменную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 11.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают вектор экспрессии или выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, или переменную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; а также последовательность, кодирующую легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 19, или переменную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 11.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающему получение клетки-хозяина, содержащей вектор экспрессии или выделенный полинуклеотид, или полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, или переменную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; а также последовательность, кодирующую легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 19, или переменную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 11; и культивирование клетки-хозяина.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают способ получения анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, дополнительно включающий выделение и очистку анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Краткое описание фигур

Фигура 1. Локализация Sema3A в глазах человека.

Локализация Sema3A в глазах человека в предварительно определенных образцах сетчатки от людей-доноров с диабетической ретинопатией или первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) в анамнезе по сравнению с людьми того же возраста из контрольной группы (контрольный возраст) и субъектами с диабетом, но без глазной патологии (контроль диабетической макулопатии). Sema3A обнаружен в стенке кровеносных сосудов сетчатки. Кроме того, в слое ганглиозных клеток сетчатки наблюдались неидентифицированные, но характерные флуоресцентные объекты Sema3A.

5
10
Фигура 2. Ингибирование VEGF-опосредованных эффектов – VEGF-A индуцированной проницаемости в сетчатке серых крыс.

Флуоресценция сетчатки при использовании красителя Evans Blue применяют в качестве индикатора проницаемости для оценки просачивания из сосудов. Интравитреальная инъекция VEGF-A вызывает гиперпроницаемость сетчатки. Антитело по настоящему изобретению, связывающееся с А-доменом Nrp1, ингибирует индуцированную VEGF-A проницаемость сетчатки, подобно ловушке VEGF (афлиберцепту). Антитело, направленное против лиганда Nrp1 семафорина 3А (антитело Sema3A), не ингибирует индуцированную VEGF-A проницаемость в сетчатке.

20
Фигура 3. Влияние антитела по настоящему изобретению и обработки анти-VEGF на плотность ведущих клеток, аваскулярную область и преретинальные пучки в модели мышей с индуцированной кислородом ретинопатией (КИР).

Плотность ведущих клеток, аваскулярная область и преретинальная неоваскуляризация (пучки) исследованы на модели кислород-индуцированной ретинопатии у мышат. Животные подвергались воздействию 75% кислорода от P7 до P12 и получали однократную инъекцию антитела в стекловидное тело после возвращения к нормоксии на P12. Контрольное антитело направлено против тринитрофенола. На P17 готовили плоские препараты сетчатки, окрашивали изолектином В4 и использовали для подсчета ведущих клеток и определения размера аваскулярной области сетчатки. Антитело по настоящему изобретению, связывающееся с А-доменом Nrp1, увеличивает плотность ведущих клеток и уменьшает аваскулярная область, в то время как афлиберцепт-ловушка VEGF этого не делает (фиг. 3А, 3В). Корреляция между плотностью ведущих клеток и аваскулярной площадью показана на фиг. 3Б.

Противоположный глаз использовали для гистологических срезов глазной

ванночки и подсчета преретинальных ядер. Преретинальная неоваскуляризация сильнее ингибировалась афлиберцептом, чем антителом по настоящему изобретению (фиг. 3Г).

5 Фигура 4. Связывание антитела по настоящему изобретению с VEGF и Nrp1.

Связывание антитела по настоящему изобретению с Nrp1 человека (hNrp1) в присутствии биотинилированного фактора роста эндотелия сосудов человека-165 (hVEGF165 – Biotinylated Human Vascular Endothelial Growth Factor-165) проводили методом биослойной интерферометрии (BLI – Bio-Layer Interferometry). Биотинилированный hVEGF165 захватывается наконечником стрептавидинового датчика, используя 10 мкг/мл биотинилированного hNFAM1 (или буфера) (точка А на фиг. 4). После промывания наконечников датчиков, 100 нМ Nrp1 человека захватывают через hVEGF165 (точка Б на фиг. 4). В итоге датчики погружали в различные концентрации антитела по настоящему изобретению (100 нМ и 400 нМ), чтобы увидеть, наблюдается ли связывание (точка В на фиг. 4). Фигура подтверждает, что hNrp1 связывается с биотинилированным hVEGF165. Фигура также показывает, что после такого взаимодействия антитело по настоящему изобретению все еще способно связываться с hNrp1, даже если оно одновременно связано с hVEGF165. Это указывает на то, что антитело по настоящему изобретению не препятствует связыванию VEGF и Nrp1 человека.

10
15
20

Фигура 5. Пролиферация клеток эндотелия, индуцированная VEGF-A.

Пролиферацию эндотелиальных клеток исследовали в эндотелиальных клетках микрососудов сетчатки человека (HRMEC – human retinal microvascular endothelial cells) с использованием системы прижизненного анализа клеток Incucyte (фирма Sartorius). В этом функциональном анализе добавление рекомбинантного белка VEGF-A к субконфлюэнтному слою HRMEC индуцирует их пролиферацию. Антитело по настоящему изобретению не предотвращает пролиферацию эндотелиальных клеток, индуцированную VEGF-A, тогда как ловушка VEGF афлиберцепт (продукт Eylea®) демонстрирует дозозависимое снижение индуцированной VEGF-A пролиферации HRMEC.

25
30

Фигура 6. Анализ формирования эндотелиальной сети, индуцированной VEGF-A.

In vitro ангиогенез оценивают в анализе формирования сети в совместной культуре клеток эндотелия/фибробластов. В этом функциональном анализе VEGF-A индуцирует образование эндотелиальных сетей поверх слитого слоя фибробластов. Эффективность и активность (IC_{50}) примера антитела по
5 настоящему изобретению и ловушки VEGF (бевацизумаб, продукт Авастин®) оценивали по предотвращению формирования сети, индуцированного 10 нг/мл VEGF-A. Антитело по настоящему изобретению не предотвращает образование эндотелиальной сети, индуцированной VEGF-A, тогда как ловушка VEGF (бевацизумаб, продукт Avastin®) демонстрирует дозозависимое снижение
10 образования сети, индуцированной VEGF-A.

Фигура 7. Зона хориоидальных неоваскулярных поражений у крыс Brown Norway после глазной лазерной фотокоагуляции.

Животным вводили две интравитреальные инъекции контрольного антитела IgG (109 мкг/глаз), антитела по настоящему изобретению (низкая доза 54,5
15 мкг/глаз; высокая доза составляет 109 мкг/глаз) или VEGF-ловушки Eylea® (200 мкг/глаз) на 1 и 8 сутки. Лазерную фотокоагуляцию проводили в первые сутки непосредственно перед первой интравитреальной инъекцией. Зону поражения исследуют на 15е сутки путем окрашивания изолектином В4 пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)/ хориоидеи/ плоского крепления склеры. Данные
20 представлены в виде средней величины \pm SEM. Статистический анализ проводили с помощью непарного двустороннего t-теста (****, $p < 0,0001$).

Подробное описание изобретения

Определения

Обобщенная структура антител или иммуноглобулина хорошо известна
25 специалистам в данной области, эти молекулы представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, обычно около 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью одной дисульфидной связью с образованием гетеродимера, а гетеротримерная молекула формируется
30 посредством ковалентной дисульфидной связи между двумя идентичными тяжелыми цепями гетеродимеров. Хотя легкая и тяжелая цепи связаны друг с другом одной дисульфидной связью, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями варьирует и зависит от изотипа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет регулярно расположенные

внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на
амино-конце вариабельный домен (V_H = вариабельная тяжелая цепь), за которым
следуют три или четыре константных домена (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} и C_{H4}), а также
шарнирную область между C_{H1} и C_{H2} . Каждая легкая цепь имеет два домена:
5 аминоконцевой вариабельный домен (V_L = вариабельная легкая цепь) и
карбоксиконцевой константный домен (C_L). Домен V_L нековалентно связан с
доменом V_H , тогда как домен C_L обычно ковалентно связан с доменом C_{H1} через
дисульфидную связь. Предположительно определенные аминокислотные остатки
образуют поверхность контакта между вариабельными доменами легкой и
10 тяжелой цепей (Chothia с соавт., *J. Mol. Biol.*, 1985, 186:651-663.)

Некоторые домены внутри вариабельных доменов сильно различаются у
разных антител, т.е. являются «гипервариабельными». Эти гипервариабельные
домены содержат остатки, которые непосредственно участвуют в связывании и
определении специфичности каждого конкретного антитела в отношении его
15 специфической антигенной детерминанты. Гипервариабельность, как в
вариабельных доменах легкой цепи, так и в вариабельных доменах тяжелой
цепи, сосредоточена в трех сегментах, известных как области, определяющие
комплементарность (CDR), или гипервариабельные петли (HVL – hypervariable
loop). CDR определяют сравнением последовательностей согласно описанию в
20 кн.: Kabat с соавт., «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 1991, 5^е
изд., Public Health Service, National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд, тогда
как HVL структурно определены в соответствии с трехмерной структурой
вариабельного домена, как описано Chothia, Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901-
917. В тех случаях, когда эти два метода приводят к несколько разным
25 идентификациям CDR, предпочтение отдается структурному определению. По
определению Kabat, CDR-L1 расположен примерно в остатках 24-34, CDR-L2
примерно в остатках 50-56 и CDR-L3 примерно в остатках 89-97 в вариабельном
домене легкой цепи; CDR-H1 расположен примерно у остатков 31-35, CDR-H2
примерно у остатков 50-65 и CDR-H3 примерно у остатков 95-102 в
30 вариабельном домене тяжелой цепи. Таким образом, CDR1, CDR2, CDR3
тяжелой и легкой цепей определяют уникальные и функциональные свойства,
специфичные для данного антитела.

Три CDR в каждой из тяжелой и легкой цепей разделены каркасными
областями (FR – framework region), которые содержат последовательности,

имеющие тенденцию к меньшей вариабельности. От amino-конца до карбокси-конца вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи FR и CDR располагаются в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Конфигурация FR, состоящая в основном из β -листов, приводит CDR в каждой из цепей в непосредственную близость друг к другу, а также к CDR из другой цепи.

5 Полученная конформация влияет на сайт связывания антигена (см. Kabat с соавт., *NIH Publ.*, 1991, No. 91-3242, том I, сс. 647-669), хотя не все остатки CDR обязательно непосредственно участвуют в связывании антигена.

Остатки FR и константные домены Ig не принимают непосредственного участия в связывании антигена, но способствуют связыванию антигена и/или опосредуют эффекторную функцию антитела. Полагают, что некоторые остатки FR обладают существенным воздействием на связывание антигена по крайней мере тремя способами: путем нековалентного связывания непосредственно с эпитопом, путем взаимодействия с одним или несколькими остатками CDR и

10 путем воздействия на поверхность контакта между тяжелой и легкой цепями. Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антигена, но опосредуют различные эффекторные функции Ig, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC – antibody-dependent cellular cytotoxicity), комплементзависимой цитотоксичности (CDC –

15 complement-dependent cytotoxicity) и антителозависимом клеточном фагоцитозе (ADCP – antibody-dependent cellular phagocytosis).

20

Легкие цепи иммуноглобулинов позвоночных относятся к одному из двух четко различающихся классов, каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности константного домена. Для сравнения,

25 тяжелые цепи иммуноглобулинов млекопитающих относятся к одному из пяти основных классов в соответствии с последовательностью константных доменов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG и IgA далее делятся на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, и IgA₂, соответственно. Константные домены тяжелой цепи, соответствующие различным классам иммуноглобулинов,

30 называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации классов нативных иммуноглобулинов хорошо известны.

Термины «антитело», «анти-Nrp1A антитело», «гуманизированное анти-Nrp1A антитело» и «вариант гуманизированного анти-Nrp1A антитела» используют в настоящем изобретении в самом широком смысле, и они конкретно охватывают моноклональные антитела (включая полноразмерные
5 моноклональные антитела), мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, такие как переменные домены и другие части антител, которые проявляют желаемую биологическую активность, например связывание с Nrp1A.

Термин «моноклональное антитело» (mAb) относится к антителу из
10 популяции по существу однородных антител; то есть отдельные антитела в этой популяции идентичны, за исключением встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, поскольку они направлены против одной антигенной детерминанты, «эпитопа». Таким образом, определение
15 «моноклональный» указывает на по существу однородную популяцию антител, направленных на идентичный эпитоп, и не должно толковаться как требующее получения антител каким-либо конкретным методом. Следует понимать, что моноклональные антитела могут быть получены любым способом или методологией, известными в данной области; включая, например, гибридомный
20 метод (Kohler с соавт., *Nature*, 1975, 256:495), или способы рекомбинантной ДНК, известные в данной области (см., например, US 4816567), или способы выделения моноклональных рекомбинантно полученных с использованием фаговых антител библиотеки, используя методы, описанные в Clackson с соавт.,
Nature, 1991,352: 624-628, Marks с соавт., *J. Mol. Biol.*, 1991, 222: 581-597.

Химерные антитела состоят из переменных областей тяжелой и легкой
25 цепи антитела одного вида (например, млекопитающего, отличного от человека, такого как мышь), и константных областей тяжелой и легкой цепи антитела другого вида (например, человека) и могут быть получены путем связывания последовательностей ДНК, кодирующих переменные области антитела первого
30 вида (например, мыши), с последовательностями ДНК константных областей антитела второго вида (например, человека) и трансформации хозяина вектором экспрессии, содержащим связанные последовательности, чтобы позволить ему продуцировать химерное антитело. В другом варианте химерное антитело также может представлять собой антитело, в котором одна или несколько областей или

доменов тяжелой и/или легкой цепи идентичны, гомологичны или являются вариантом соответствующей последовательности в моноклональном антителе из другого класса или изотипа иммуноглобулина, или из консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии. Химерные антитела могут включать фрагменты таких антител при условии, что фрагмент антитела проявляет желаемую биологическую активность исходного антитела, например связывание с тем же эпитопом (см., например, US 4816567; Morrison с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984,81: 6851-6855).

Термины «фрагмент антитела», «антигенсвязывающий фрагмент», «фрагмент анти-Nrp1A антитела», «фрагмент гуманизированного анти-Nrp1A антитела», «вариант фрагмента гуманизированного анти-Nrp1A антитела» относятся к части полноразмерного анти-Nrp1A антитела, в которой сохранена переменная область или функциональная способность, например, специфическое связывание эпитопа Nrp1. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv и scFv-Fc, диатело, линейное антитело, одноцепочечное антитело, минитело, диатело, образованные из фрагментов антител, а также мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Полноразмерные антитела можно обработать ферментами, такими как папаин или пепсин, для получения полезных фрагментов антител. Расщепление папаином используется для получения двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов антител, называемых Fab-фрагментами, каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт, и остаточный Fc-фрагмент. Фрагмент Fab также содержит константный домен легкой цепи и домен C_{H1} тяжелой цепи. Обработка пепсином приводит к образованию фрагмента F(ab')₂, который имеет два сайта связывания антигена и все еще способен сшивать антиген.

Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов наличием дополнительных остатков, включая один или несколько цистеинов, в шарнирной области антитела на С-конце домена C_{H1}. Фрагменты антитела F(ab')₂ представляют собой пары фрагментов Fab', связанных остатками цистеина в шарнирной области. Также известны другие химические соединения фрагментов антител.

Фрагмент «Fv» содержит полный сайт распознавания и связывания антигена, состоящий из димера одного переменного домена тяжелой и одного переменного домена легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В этой

конфигурации три CDR каждого вариабельного домена взаимодействуют, чтобы определить сайт связывания антигена на поверхности димера V_H-V_L . В совокупности шесть CDR придают антигенсвязывающую специфичность антителу.

5 Фрагмент антитела «одноцепочечный Fv» или «scFv» представляет собой одноцепочечный вариант Fv, содержащий домены V_H и V_L антитела, где домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Одноцепочечный Fv способен распознавать и связывать антиген. Полипептид scFv может также необязательно содержать полипептидный линкер, расположенный между доменами V_H и V_L ,
10 чтобы облегчить формирование желаемой трехмерной структуры для связывания антигена за счет scFv (см., например, Pluckthun, в кн. «The Pharmacology of monoclonal Antibodies», 1994, том 113, под ред. Rosenberg и Moore, изд-во Springer-Verlag, Нью-Йорк, с. 269-315).

Другие известные фрагменты антител включают те, которые содержат пару
15 тандемных Fd-сегментов ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$), образующих пару антигенсвязывающих областей. Эти «линейные антитела» могут быть биспецифическими или моноспецифическими, как описано в публикации, например, Zarata с соавт. Protein Eng., 1995, 8(10):1057-1062.

Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела
20 представляет собой особый тип химерного антитела, которое включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его фрагмент, который способен связываться с заданным антигеном и который содержит одну или более FR, содержащих по существу аминокислоту последовательность иммуноглобулина человека и один или несколько CDR, имеющих по существу
25 аминокислотную последовательность иммуноглобулина, происходящего не от человека, а от другого вида. Такая не принадлежащая человеку аминокислотная последовательность, часто называемая «импортной» последовательностью, обычно берется из «импортного» домена антитела, в частности, вариабельного домена. Обычно гуманизированное антитело включает по меньшей мере CDR
30 или HVL не принадлежащего человеку антитела, инсертированные между FR вариабельного домена тяжелой или легкой цепи человека.

Настоящее изобретение описывает специфические гуманизированные анти-Nrp1A антитела, которые содержат CDR, полученные из мышиноного или химерного антитела, инсертированные между FR вариабельных доменов

тяжелой и легкой цепей последовательности зародышевой линии человека. Следует учитывать, что некоторые остатки FR мыши могут быть важны для функции гуманизованных антител, и поэтому некоторые остатки

5
вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей последовательности зародышевой линии человека модифицируют, чтобы они были такими же, как и в соответствующей последовательности мыши.

Используемые в настоящем изобретении выражения «антитело по настоящему изобретению» и «анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению» относятся к антителу, направленному против Nrp1, 10 предпочтительно против А-домена Nrp1, или к его антигенсвязывающему фрагменту, описанному в настоящем изобретении. Предпочтительно указанное антитело по настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); 15 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); а также переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

20 В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизованному анти-Nrp1A антителу. Гуманизованные антитела практически все содержат по меньшей мере один, а обычно два переменных домена (например, содержащиеся во фрагментах Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc и Fv), в которых все или практически все, CDR соответствуют таковым 25 иммуноглобулина, не являющимся иммуноглобулином человека, и, в частности, в данном случае CDR представляют собой мышиные последовательности, а FR представляют собой последовательности консенсусной последовательности иммуноглобулина или последовательности зародышевой линии человека. В другом объекте гуманизованное анти-Nrp1A антитело также включает по 30 меньшей мере часть Fc-области иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Обычно антитело будет содержать как легкую цепь, так и, по меньшей мере, переменный домен тяжелой цепи. Антитело также может включать одну или несколько областей тяжелой цепи C_{H1}, шарнира, C_{H2}, C_{H3} и/или C_{H4}, по мере необходимости.

Гуманизированное анти-Nrp1A антитело может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Например, константный домен может представлять собой константный домен, связывающий комплемент, когда
5 желательно, чтобы гуманизированное антитело проявляло цитотоксическую активность, причем изотипом обычно является IgG₁. Если такая цитотоксическая активность нежелательна, константный домен может быть от другого изотипа, например, IgG₂. Альтернативное гуманизированное анти-Nrp1A антитело может содержать последовательности из более чем одного класса или изотипа
10 иммуноглобулина, и выбор конкретных константных доменов для оптимизации желаемых эффекторных функций находится в пределах компетенции специалистов в данной области. В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые представляют собой антитела IgG₁ и, более конкретно, антитела IgG₁, характеризующиеся
15 пониженной эффекторной функцией.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения анти-Nrp1A антитела по настоящему изобретению представляет собой гуманизированное антитело в формате IgG1KO.

FR и CDR, или HVL, гуманизированного анти-Nrp1A антитела
20 необязательно должны точно соответствовать родительским последовательностям. Например, один или несколько остатков в импортной CDR, или HVL, или консенсусной последовательности, или последовательности FR зародышевой линии могут быть изменены (например, подвергнуты мутагенезу) путем замены, инсерции или делеции таким образом, что
25 полученный аминокислотный остаток больше не идентичен исходному остатку в соответствующем положении в любой исходной последовательности, но, тем не менее, антитело сохраняет функцию связывания с Nrp1. Такие изменения обычно не являются обширными и будут консервативными. Обычно по крайней мере 75% остатков гуманизированного антитела могут соответствовать остаткам
30 родительской консенсусной последовательности или зародышевой линии FR и импортировать последовательности CDR, чаще по крайней мере на 90% и наиболее часто более чем на 95%, или более чем на 98%, или более чем на 99%.

Остатки иммуноглобулина, которые влияют на поверхность контакта между переменными областями тяжелой и легкой цепей («интерфейс V_L-V_H»),

представляют собой остатки, которые влияют на близость или ориентацию двух цепей по отношению друг к другу. Некоторые остатки, которые могут участвовать в межцепочечных взаимодействиях, включают остатки V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 и 98 и остатки V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 и 103 (с использованием системы нумерации, установленной в кн.: Kabat с соавт., «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 1987, 5е изд., изд-во Public Health Service, Национальные институты здоровья, Бетесда). В US 6407213 также обсуждается, что в это взаимодействие могут быть вовлечены такие остатки, как остатки 43 и 85 V_L и остатки 43 и 60 V_H . Хотя эти остатки указаны только для человеческого IgG, они применимы к разным видам. Имеющие важное значение остатки антител, которые, как следовало ожидать, будут участвовать в межцепочечных взаимодействиях, выбирают для замены в консенсусной последовательности.

Термины «консенсусная последовательность» и «консенсусное антитело» относятся к аминокислотной последовательности, которая включает наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в каждом месте во всех иммуноглобулинах любого конкретного класса, изоформа или субъединичной структуры, например, варибельного домена иммуноглобулина человека. Консенсусная последовательность может быть основана на иммуноглобулинах определенного вида или многих видов. Под «консенсусной» последовательностью, структурой или антителом понимают консенсусную последовательность человека, как описано в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, и которая относится к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в каждом месте во всех человеческих иммуноглобулинах любого определенного класса, изоформа или субъединичной структуры. Таким образом, консенсусная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую в каждом положении аминокислоту, которая присутствует в одном или нескольких известных иммуноглобулинах, но которая может не полностью дублировать всю аминокислотную последовательность любого отдельного иммуноглобулина. Консенсусная последовательность варибельной области не получена из какого-либо природного антитела или иммуноглобулина (кн.: Kabat с соавт., «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 1991, 5е изд., изд-во Public Health Service,

Национальные институты здоровья, Бетесда, Мэриленд) и их вариантов. FR консенсусных последовательностей тяжелой и легкой цепей и их варианты являются источником полезных последовательностей для получения гуманизированных анти-Nrp1A антител. См., например, US 6037454 и US 6054297.

Последовательности зародышевой линии человека естественным образом обнаруживаются в человеческой популяции. Комбинация этих генов зародышевой линии создает разнообразие антител. Последовательности антител зародышевой линии для легкой цепи антител происходят из консервативных v -генов и j -генов каппа или лямбда зародышевой линии человека. Точно так же последовательности тяжелых цепей происходят из v -, d - и j -генов зародышевой линии (в кн.: LeFranc, M-P, LeFranc, G, «The Immunoglobulin Facts Book», изд-во Academic Press, 2001).

«Изолированным» называют антитело, которое идентифицировано и отделено и/или выделено из компонентов его естественной среды. Загрязняющие компоненты естественной среды антитела представляют собой материалы, которые могут мешать диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут представлять собой ферменты, гормоны или другие белковые или небелковые растворенные вещества. Согласно одному из объектов настоящего изобретения антитело очищают по меньшей мере до более чем 95% выделения по массе антитела.

Термин «действие антитела» относится к факторам/свойствам, которые способствуют распознаванию антигена антителом или эффективности антитела *in vivo*. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения этот термин относится к способности антитела предотвращать коллапс цитоскелета в клетках сетчатки. Изменения в аминокислотной последовательности антитела могут влиять на такие свойства антитела, как фолдинг, и могут влиять на физические факторы, такие как начальная скорость связывания антитела с антигеном (k_a), константа диссоциации антитела от антигена (k_d), константа аффинности антитела к антигену (K_d), конформация антитела, стабильность белка и время полужизни антитела.

В контексте настоящего изобретения термины «идентичный» или «процентная идентичность» двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям, или

к таким последовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании для определения максимального соответствия. Для определения процентной идентичности последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, в последовательность первой аминокислоты или последовательности нуклеиновой кислоты могут быть введены гэпы для оптимального выравнивания со второй последовательностью аминокислоты или нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы идентичны в этом положении. Процентная идентичность между двумя последовательностями является функцией числа идентичных позиций, общих для последовательностей (т. е. % идентичности = количество идентичных позиций/общее количество позиций (например, перекрывающихся позиций)×100). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после того, как в последовательности введены гэпы (например, за исключением дополнительной последовательности, выходящей за пределы сравниваемых последовательностей). Например, при сравнении последовательностей переменной области последовательности лидера и/или константного домена не учитываются. Для сравнения последовательностей между двумя последовательностями «соответствующая» CDR относится к CDR в одном и том же месте в обеих последовательностях (например, CDR-H1 в каждой последовательности).

Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Предпочтительным примером, не ограничивающим области охвата настоящего изобретения, является применение математического алгоритма для сравнения двух последовательностей; такой алгоритм описан в публикации Karlin, Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87:2264-2268, в модификации Karlin и Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST в работе Altschul с

соавт., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215:403-410. Поиск нуклеотидов BLAST можно проводить с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей представляющий интерес белок. Поиск белков BLAST можно выполнять с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные представляющему интерес белку. Чтобы получить выравнивание с гэпами для сравнения, можно использовать программу Gapped BLAST, как описано в работе Altschul с соавт., *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25:3389-3402. В другом варианте, можно использовать программу PSI-Blast для повторного поиска, который выявляет отдаленные сходства между молекулами (Id.). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, не ограничивающим возможностей применения других алгоритмов, является алгоритм Майерса и Миллера, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью программного пакета выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весов остатков PAM120, штраф за длину гэпа 12 и штраф за гэп 4. Дополнительные алгоритмы анализа последовательности известны в данной области техники и включают в себя ADVANCE и ADAM, описанные в работе Torellis, Robotti, *Comput. Appl. Biosci.*, 1994, 10:3-5; описание FASTA приводят в работе Pearson, Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85:2444-2448. В программе FASTA `ktup` является контрольной опцией, которая устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если `ktup=2`, сходные области в двух сравниваемых последовательностях обнаруживаются путем просмотра пар выровненных остатков; если `ktup=1`, исследуются одиночные выровненные аминокислоты. Показатель `ktup` может быть установлен равным 2 или 1 для белковых последовательностей или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. Значение по умолчанию, если `ktup` не указан, равно 2 для белков и 6 для ДНК. В другом варианте выравнивание белковых последовательностей может быть выполнено с использованием алгоритма CLUSTAL W, как описано Higgins с соавт., *Methods Enzymol.*, 1996, 266:383-402.

В контексте настоящего изобретения понятия «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» используют взаимозаменяемо, и все эти понятия относятся к последующим генерациям клеток. Таким образом, «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичную клетку субъекта и культуры, полученные из нее, независимо от количества пересевов.

Термин «млекопитающее» для целей лечения относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарка, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.п.

Предпочтительно млекопитающим является человек.

В контексте настоящего изобретения понятия «заболевание» или «расстройство» означают любое состояние, при котором может помочь лечение гуманизированным анти-Nrp1A антителом, описанным в настоящем заболевании. К этим понятиям относятся хронические и острые расстройства или заболевания, включая те патологические состояния, которые предрасполагают организм млекопитающего к рассматриваемому расстройству.

Термин «интравитреальная инъекция» относится к введению анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в стекловидное тело пациента.

Термин «подкожное введение» относится к введению анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента под кожу пациента животного или человека, предпочтительно в карман между кожей и подлежащей тканью, путем относительно медленного, устойчивого введения доставки из места его нахождения. Защемление или оттягивание кожи вверх и в сторону от подлежащей ткани может привести к образованию кармана.

Термин «подкожная инфузия» относится к введению лекарственного средства под кожу животного или человека, предпочтительно внутри кармана между кожей и подлежащей тканью, путем относительно медленного, устойчивого введения из места нахождения лекарственного средства в течение периода времени, включающего, но, не ограничивая области охвата настоящего изобретения этими сроками, 30 мин или менее, или 90 мин или менее. Необязательно инфузия может быть произведена путем подкожной имплантации насоса для доставки лекарственного средства, имплантированного под кожу животного или человека, при этом насос доставляет заранее определенное

количество лекарственного средства в течение заданного периода времени, такого как 30 мин, 90 мин, или периода времени, охватывающего продолжительность схемы лечения.

5 Термин «подкожный болюс» относится к введению лекарственного средства под кожу животного или человека, причем болюсное введение лекарственного средства составляет приблизительно менее 15 мин; в другом объекте настоящего изобретения менее 5 мин и в еще одном объекте – менее 60 сек. В еще одном объекте введение осуществляют в карман между кожей и подлежащей тканью, причем карман может быть создан защемлением или 10 оттягиванием кожи вверх и в сторону от подлежащей ткани.

Термин «терапевтически эффективное количество» применяют для обозначения количества анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые облегчают или ослабляют один или несколько симптомов заболевания, подвергаемого лечению. При этом именно эта сумма имеет 15 положительный результат для пациента. Эффективность можно измерить обычными методами, в зависимости от состояния, подлежащего лечению. Например, при заболеваниях или расстройствах глаз/сетчатки, характеризующихся клетками, экспрессирующими Nrp1A, эффективность можно измерить, определив степень ответа, например восстановления зрения, или 20 оценив время задержки прогрессирования заболевания.

В контексте настоящего изобретения термины «лечение» и «терапия», а также другие подобные по смыслу термины, предназначены для включения терапевтических, а также профилактических или подавляющих мер в отношении заболевания или расстройства, приводящих к любому клинически желаемому 25 или благоприятному эффекту, включая, помимо прочего, облегчение или ослабление одного или нескольких симптомов, регрессию, замедление или прекращение прогрессирования заболевания или расстройства. Так, например, термин лечение включает введение анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента до или после появления симптома заболевания 30 или расстройства, тем самым предотвращая или устраняя один или несколько признаков заболевания или расстройства. В качестве другого примера термин включает введение анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента после клинического проявления заболевания для борьбы с симптомами заболевания. Кроме того, введение анти-Nrp1A антитела или его

антигенсвязывающего фрагмента после начала заболевания и после развития клинических симптомов, когда введение влияет на клинические параметры заболевания или расстройства, независимо от того, приводит ли лечение к облегчению заболевания, в данном контексте означает «лечение» или «терапию». Более того, при условии, что композиции по настоящему изобретению, либо сами по себе, либо в комбинации с другим терапевтическим агентом, облегчают или улучшают по меньшей мере один симптом заболевания, подвергаемого лечению, по сравнению с этим симптомом в отсутствие использования композиции анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, результат следует рассматривать как эффективное лечение основного заболевания, независимо от того, облегчаются ли все симптомы заболевания или нет.

Термин «вкладыш в упаковку» используют для применительно к инструкции, обычно включаемой в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся использования таких терапевтических продуктов.

Антитело на настоящему изобретению

Первый объект настоящего изобретения относится к анти-Nrp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту. Предпочтительно указанное антитело является гуманизированным анти-Nrp1A антителом, более предпочтительно гуманизированным моноклональным анти-Nrp1A антителом.

При первоначальной характеристике библиотека антител, нацеленных на варианты Nrp1A, была создана путем помещения областей CDR из мышинных антител или антител человека, полученных из фаговой библиотеки, в FR консенсусных переменных доменов тяжелой и легкой цепи человека и, кроме того, путем конструирования FR с различными изменениями.

В результате получено гуманизированное антитело, направленное против Nrp1A, с улучшенными свойствами, как описано в настоящем изобретении. Последовательности антител по настоящему изобретению показаны в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Название	Аминокислотные последовательности	SEQ ID NO
HCDR1	GFTFSSYAMS	SEQ ID NO: 1
HCDR2	SISRTGYTYYAESVKG	SEQ ID NO: 2
HCDR3	VGTAFDY	SEQ ID NO: 3
LCDR1	RASQSISSYLN	SEQ ID NO: 4
LCDR2	AASSLQS	SEQ ID NO: 5
LCDR3	QQSYSTPLT	SEQ ID NO: 6
VH-вариант 1	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDESKQTLYLQMQLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 10
VL – вариант а	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTK VEIK	SEQ ID NO: 11
VH – вариант 2	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 12
VH – вариант 3	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDDSKQTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 13
VH-вариант 4	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMQLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 14
VH-вариант 5	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDESKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 15
VH-вариант 6	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDDSKQTLYLQMQLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 16
VH-вариант 7	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDESKNTLYLQMQLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 17
Тяжелая цепь-клон I	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDESKQTLYLQMQLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 18
Легкая цепь-клон I	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 19
Тяжелая цепь-клон II	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 20

Легкая цепь-клон III	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 19
Тяжелая цепь-клон III	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDDSKQTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 21
Легкая цепь-клон IV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 19
Тяжелая цепь-клон IV	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMQLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 22
Легкая цепь-клон V	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 19
Тяжелая цепь-клон V	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDESKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 23
Легкая цепь-клон VI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 19
Тяжелая цепь-клон VI	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDDSKQTLYLQMQLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 24

Легкая цепь-клон VII	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 19
Тяжелая цепь-клон VII	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS ISRTGYTYYAESVKGRFTISRDESKNTLYLQMQLKTEDTAVYYCARVGT AFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 25

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие:

5 - вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); и

10 - вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие:

15 - вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, 20 SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; и

25 - вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Ngp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие:

5 - переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17, и

- переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

10 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Ngp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие:

а. переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

15 б. переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

20 в. переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

г. переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

25 д. переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

е. переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 11, соответственно; и

30 ж. переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 11, соответственно.

В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Ngp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

- 5 - тяжелую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25; и
- легкую цепь, содержащая, предпочтительно состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19.

10 В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-Ngp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие:

- а. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, причем указанное антитело обозначается «клон I»;
- 15 б. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, причем указанное антитело обозначается «клон II»;
- в. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность
- 20 SEQ ID NO: 19, причем указанное антитело обозначается «клон III»;
- г. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, причем указанное антитело обозначается «клон IV»;
- д. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ
- 25 ID NO: 23, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, причем указанное антитело обозначается «клон V»;
- е. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, причем указанное антитело обозначается «клон VI»; или
- 30 ж. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, причем указанное антитело обозначается «клон VII»;

Мутанты IgG1-КО были получены путем интродукции мутаций в область Fc. Мутанты для понижения или подавления эффекторной функции известны

специалистам и подробно раскрыты в предшествующем уровне техники, например, в публикации Wang с соавт., *Protein Cell*, 2018, 9(1):63-73; Stewart с соавт., *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2014, 2:29. Обычно к перечню мутаций, вводимых в Fc-область IgG1 для снижения эффекторной функции Fc, которыми однако перечень не ограничивается, относятся:

- L234A и L235A;
- L234A, L235A и N297Q;
- L234A, L235A и P329G; или
- L234A, L235A и D265A;

10 При чем остатки пронумерованы согласно индексу EU по Kabat.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению включает две мутации L234A и L235A в области Fc для снижения эффекторной функции.

15 Описанные в настоящем изобретении области CDR, в SEQ ID NO: 1-6, представлены согласно CCG (Chemical Computing Group – Химическая Компьютерная Группа, продемонстрированная в работе Almagro с соавт., *Proteins*, 2011; 79:3050-3066; Maier с соавт., *Proteins*, 2014, 82:1599-1610) ниже в табл. 2.

Таблица 2

CDR	CCG Seq	Положение CCG	SEQ ID NO:
HCDR1	GFTFSSYAMS	26-35	1
HCDR2	SISRTGYTYAESVKG	50-65	2
HCDR3	VGTAFDY	98-104	3
LCDR1	RASQSISSYLN	24-34	4
LCDR2	AASSLQS	50-56	5
LCDR3	QQSYSTPLT	89-97	6

20 Дополнительная система нумерации, основанная на нумерации Kabat, суммируется в табл. 3 ниже.

Таблица 3

CDR	Последовательность Kabat	Положение последовательности Kabat	SEQ ID NO:
HCDR1	SYAMS	31-35	7
HCDR2	SISRTGYTYAESVKG	50-65	2
HCDR3	VGTAFDY	98-104	3
LCDR1	RASQSISSYLN	24-34	4
LCDR2	AASSLQS	50-56	5
LCDR3	QQSYSTPLT	89-97	6

Дополнительная система нумерации, основанная на нумерации Chothia, представлена в табл. 4 ниже.

Таблица 4

CDR	Последовательность Chothia	Положение последовательности Chothia	SEQ ID NO:
HCDR1	GFTFSSY	26-32	8
HCDR2	SRTGY	51-57	9
HCDR3	VGTAFDY	98-104	3
LCDR1	RASQSISSYLN	24-34	4
LCDR2	AASSLQS	50-56	5
LCDR3	QQSYSTPLT	89-97	6

5 Таким образом, согласно конкретному объекту настоящего изобретения, предусматривают анти-Ngp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

10 - вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3), и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3); или

15 - вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3), и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3); или

20 - вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3), и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

Анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению связывается с высокой аффинностью с Nrp1A человека. В варианте осуществления настоящего изобретения, касательно настоящего объекта, анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению связывается с Nrp1A человека с $K_D < 50$ нМ. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению связывается с Nrp1A человека с $K_D < 15$ нМ, как показано в примере 8.

Анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению связывается с Nrp1A макака-крабоеда, Nrp1A мыши, Nrp1A крысы и Nrp1A песчанки.

Высокая аффинность связывания антитела по настоящему изобретению способствует увеличению времени нейтрализации Nrp1A после интравитреальной инъекции и дополнительно позволяет снизить частоту инъекций. Кроме того, более высокая аффинность связывания позволяет вводить пониженные дозы, ограничивая возможные побочные эффекты. Улучшенная аффинность связывания и уменьшенная частота инъекций значительно улучшают эффективность лечения пациентов, нуждающихся в этом. Это также дает ценные преимущества для пациента, особенно улучшение соблюдения режима приема лекарств.

Анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению предотвращает индуцированный Sema3A коллапс цитоскелета в клетках сетчатки с функциональной активностью менее 130 пМ, предпочтительно менее 110 пМ, более предпочтительно менее 100 пМ. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения анти-Nrp1 антитело по настоящему изобретению предотвращает индуцированный Sema3A коллапс цитоскелета в клетках сетчатки с функциональной активностью 98 пМ, как показано в примере 4. Результаты иллюстрируют эффективность антитела по настоящему изобретению по ингибированию вазорепульсии, индуцированной Sema3A.

Анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению дополнительно ингибирует проницаемость гемато-ретиального барьера, индуцированную VEGF-A с функциональной активностью менее 4 нМ, предпочтительно менее 3 нМ, более предпочтительно менее 1 нМ. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению предотвращает индуцированную VEGF потерю целостности клеток сетчатки с функциональной эффективностью 0,74 нМ, как показано в примере 5.

Результаты иллюстрируют эффективность антитела по настоящему изобретению ингибировать проницаемость гемато-ретиального барьера, индуцированную VEGF-A.

5 Согласно другому объекту установлено, что анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению имеет низкий риск иммуногенности, как описано в примере 9. Это основано на прогнозе иммуногенности антитела *in silico*. Риск иммуногенности обычно оценивают с помощью различных хорошо известных методов, таких как компьютерный алгоритм прогнозирования Т-клеточных эпитопов, основного фактора, влияющего на иммуногенность. Действительно, 10 сообщалось, что последовательности, содержащие Т-клеточные эпитопы, присутствующие в представляющих интерес белках, могут быть определены на основании прогноза с помощью алгоритма, основанного на вычислительной матрице, доступной под названием EpiMatrix (фирма EpiVax). Специалист в данной области может обратиться к Van Walle с соавт., *Expert Opin Biol Ther.*, 15 2007, 7(3): 405-18; Jawa с соавт., *Clin Immunol.* 2013, 149(3):534-555.

Антитело по настоящему изобретению отличается от терапевтических подходов, основанных на нацеливании на Sema3. Действительно, антитело по изобретению ингибирует проницаемость гемато-ретиального барьера, индуцированную VEGF, предпочтительно VEGF-A, в то время как этот эффект 20 не наблюдается с соединениями, нацеленными на Sema3A. Следовательно, терапевтический подход анти-Nrp1A, основанный на антителе по настоящему изобретению, имеет преимущество:

- ингибирует вазорепульсивный эффект Sema3A;
- ингибирует проницаемость гемато-ретиального барьера, 25 индуцированную Sema3A; и
- ингибирует проницаемость гемато-ретиального барьера, индуцированную VEGF-A.

Антитело по настоящему изобретению отличается от терапевтических подходов, основанных на ингибировании VEGF. Действительно, антитело по 30 настоящему изобретению ингибирует связывание Sema3A с Nrp1, что приводит к ингибированию вазорепульсии, индуцированной Sema3A, в конечном итоге к улучшению реваскуляризации, особенно у пациентов с диабетической макулярной ишемией (ДМИ).

Кроме того, в настоящем изобретении сравнивают активность антитела по настоящему изобретению, *inter alia*, с продуктами Avastin®, Eylea® и Lucentis® в анализе потери целостности клеток, индуцированной VEGF, как показано в примере 5. Avastin®, Eylea® и Lucentis® все нацелены на VEGF, в то время как антитело по настоящему изобретению нацелено на домен А в Nrp1. Следует отметить, что эффективность антитела по настоящему изобретению в анализе VEGF-индуцированной потере целостности клеток сходна с эффективностью Avastin® и Eylea® и лучше, чем эффективность Lucentis®. Таким образом, в настоящем изобретении разработали антитело, которое:

- предотвращает связывание Nrp1 и Sema3A таким образом, чтобы ингибировать вазорепульсию и индукцию проницаемости гемато-ретиального барьера с помощью Sema3A, и
- неожиданно воздействует на проницаемость гемато-ретиального барьера, индуцированную VEGF-А.

В настоящем изобретении показано, что антитело по настоящему изобретению проявляет более ценные свойства, чем другие антитела или фрагменты, нацеленные на Nrp1, известные в предшествующем уровне техники и описанные в настоящем изобретении в примере 3. Указанные дополнительные антитела нацелены на разные эпитопы в Nrp1. Авторы настоящего изобретения сравнили свойства антитела по настоящему изобретению и:

- антитела, направленные против А-домена Nrp1 (YW64.3); а также
- антитела, направленные против В-домена Nrp1 (YW107.4.87).

В настоящем изобретении показано, что антитело по настоящему изобретению является эффективным в анализе коллапса цитоскелета, индуцированного Sema3A, в отличие от YW107.4.87 (пример 4). Эти результаты показывают, что антитело по настоящему изобретению ингибирует вазорепульсию, индуцированную Sema3A, что приводит к улучшенным свойствам для ревазуляризации, в частности, у пациентов с диабетической макулярной ишемией (ДМИ).

В настоящем изобретении также показано, что антитело по настоящему изобретению обладает улучшенной термостабильностью по сравнению с YW64.3, что было измерено с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСЦ), которая измеряет теплоемкость как функцию ДСЦ (пример 11). Эти результаты показывают, что антитело по настоящему изобретению

остается в своей нативной и активной конформации при физиологической температуре. Следует отметить, что более высокие средние точки теплового перехода (*T_m* – thermal transition midpoint) отражают улучшенную стабильность белка при пониженных температурах. Таким образом, в настоящем изобретении 5 показано, что антитело по настоящему изобретению проявляет улучшенное свойство термостабильности, способствующее улучшенной терапевтической эффективности, при этом позволяя снизить дозу и частоту инъекций пациентам. Кроме того, *T_m* демонстрирует продленный срок полужизни и улучшенную стабильность терапевтического продукта с течением времени.

10 Гуманизация вариантов аминокислот

Дополнительные варианты анти-Nrp1A антител и фрагментов антител могут быть сконструированы на основе набора CDR, идентифицированных по 15 последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 1-6. Следует понимать, что в указанных вариантах анти-Nrp1A антител и фрагментов антител аминокислотная последовательность CDR остается неизменной, но окружающие области, например FR, могут быть сконструированы. Варианты аминокислотной последовательности анти-Nrp1A антитела можно получить путем внедрения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК анти-Nrp1A антитела или 20 путем пептидного синтеза. Такие варианты включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях анти-Nrp1A антител в примерах настоящего изобретения. Любую комбинацию делеций, инсерций и замен создают для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми свойствами.

Аминокислотные замены также могут изменять посттрансляционные процессы 25 гуманизированного или вариантного анти-Nrp1A антитела, такие как изменение числа или положения сайтов гликозилирования.

Другой тип аминокислотного варианта антитела включает изменение исходного варианта гликозилирования антитела. Термин «изменение» в данном контексте означает удаление одного или нескольких углеводных фрагментов, 30 обнаруженных в антителе, и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые ранее не присутствовали в антителе.

В некоторых объектах настоящего изобретения предусматривают молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты аминокислотной последовательности описанных в настоящем изобретении анти-Nrp1A антител.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности анти-Nrp1A антитела, получают различными методами, известными в данной области техники. Эти методы включают, помимо прочего, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с помощью олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или невариантной версии анти-Nrp1A антитела.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-Nrp1A антитело является фрагментом антитела. Разработаны, методы получения фрагментов антител. Фрагменты могут быть получены путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto с соавт., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, 24:107-117; Brennan с соавт., *Science*, 1985, 229:81). В другом варианте фрагменты могут быть получены непосредственно в рекомбинантных клетках-хозяевах. Например, фрагменты Fab'-SH могут быть выделены непосредственно из *E. coli* и химически связаны с образованием фрагментов F(ab')₂ (см., например, Carter с соавт., *Bio/Technology*, 1992, 10:163-167). С помощью другого подхода фрагменты F(ab')₂ могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Специалисту в данной области техники будут очевидны также другие способы получения фрагментов антител.

Анти-Nrp1A антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут включать модификации.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения может оказаться желательным использовать фрагмент анти-Nrp1A антитела, а не само интактное антитело. Может оказаться желательным модифицировать фрагмент антитела, чтобы увеличить время его полужизни в сыворотке. Этого можно достичь, например, путем включения эпитопа, связывающего рецептор реутилизации, во фрагмент антитела. В одном методе соответствующий участок фрагмента антитела может быть изменен (например, мутирован) или эпитоп может быть включен в пептидную метку, которая затем слита с фрагментом антитела либо на конце, либо в середине, например, с помощью синтеза ДНК или пептида. См., например, WO 96/32478.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают ковалентные модификации анти-Nrp1A антител. Ковалентные модификации включают модификацию остатков цистеинила, остатков гистидила, лизинила и аминоконцевых остатков, остатков аргинила, остатков тирозила, карбоксильных боковых групп (аспартила или глутамила), остатков глутаминила и аспарагинила или остатков серила или треонила. Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное связывание гликозидов с антителом. Такие модификации могут быть выполнены путем химического синтеза или ферментативного или химического расщепления антитела. Другие типы ковалентных модификаций антитела могут быть введены в молекулу путем реакции целевых аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим агентом, который способен реагировать с выбранными боковыми цепями или аминоконцевыми остатками.

Удаление любых углеводных фрагментов в антителе может быть осуществлено химическим или ферментативным путем. Химическое дегликозилирование описано Nakimuddin с соавт., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, 259:52; Edge с соавт., *Anal. Biochem.*, 1981, 118:131. Ферментативное расщепление углеводных фрагментов антител может быть достигнуто с помощью различных эндо- и экзогликозидаз, как описано Thotakura с соавт., *Meth. Enzymol* 1987, 138:350.

Другой тип полезной ковалентной модификации включает связывание антитела с одним из множества небелковых полимеров, например, с полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, способом, изложенным в одном или нескольких из US 4640835, US 4496689, US 4301144, US 4670417, US 4791192, US 4179337.

Связывание эпитопа

Второй объект настоящего изобретения относится к антителу, которое распознает специфический «эпитоп Nrp1A». В частности, антитело по настоящему изобретению связывается с эпитопом Nrp1A человека, представленной в SEQ ID NO: 26. Другой объект настоящего изобретения относится к анти-Nrp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в аминокислотных областях 68-77 Nrp1A человека, как показано ниже в SEQ ID NO: 26.

Другой объект настоящего изобретения относится к анти-Nrp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 27.

Последовательности SEQ ID NO: 26 и 27 показаны в табл. 5 ниже.

5 Таблица 5

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
Nrp1A человека	MERGLPLLCA VLALVLAPAG AFRNDKCGDT IKIESPGYLT SPGYPHSYHP SEKCEWLIQA PDPYQRIMIN FNP HFDLEDR DCKYDYVEVF DGENENGFHR GKFCGKIAPP P VVSSGPFLF IKFVSDYETH GAGFSIRYEI FKRGPESQSN YTTSPGVIKS PGFPEKYPNS LECTYIVFAP KMSEIILEFE SFDLEPDSNP PGGMFCRYDR LEIWDGFDPV GPHIGRYCGQ KTPGRIRSSS GILSMVFYTD SAIAKEGFSA NYSVLQSSVS EDFKCMEALG MESGEIHSQ ITASSQYSTN WSAERSRLNY PENGWTPGED SYREWIQVDL GLLRFVTAVG TQGAISKETK KKYVVKTYKI DVSSNGEDWI TIKEGNKPVL FQGNTNPTDV VVAVFPKPLI TRFVRIKPAT WETGISMRFE VYGCKITDYP CSGMLGMVSG LISDSQITSS NQGDRNWMPE NIRLVTSRSG WALPPAPHSY INEWLQIDLG EEKIVRGIH QGGKHRENKV FMRKFKIGYS NNGSDWKMIM DDSKRKAKSF EGNNNYDTPE LRTFPALSTR FIRIYPERAT HGGLGLRMEL LGCEVEAPTA GPTTPNGNLV DECDDDQANC HSGTGDDFQL TGGTTVLATE KPTVIDSTIQ SEFPTYGFNC EFGWGSHTKF CHWEHDNHVQ LKWSVLTSKT GPIQDHTGDG NFIYSQADEN QKGKVARLVS P VVYSQNSAH CMTFWYHMSG SHVGTLRVKL RYQKPEEYDQ LVWMAIGHQG DHWKEGRVLL HKSLKLYQVI FEGEIGKGNL GGIAVDDISI NNHISQEDCA KPADLDKKNP EIKIDETGST PGYEGEGEGD KNISRKPGNV LKTLDPILIT HAMSALGVL LGAVCGVVLY CACWHNGMSE RNLSALENYN FELVDGVKLL KDKLNTQSTY SEA	26
Эпитоп Nrp1A	MINFNPHFDL	27

10 В настоящем изобретении термин «эпитоп Nrp1A» относится к молекуле (например, пептиду) или фрагменту молекулы, которые способны связываться с анти-Nrp1A антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Эти термины дополнительно включают, например, антигенную детерминанту Nrp1A, распознаваемую любым из антител или фрагментов антител по настоящему изобретению, которая имеет комбинацию CDR легкой и тяжелой цепей, выбранную из областей CDR тяжелой цепи SEQ ID No: 1-3 и CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4-6.

15 Антигенные эпитопы Nrp1A могут быть включены в белки, фрагменты белков, пептиды и т.п. Эпитопы чаще всего представляют собой белки, короткие олигопептиды, имитаторы олигопептидов (т. е. органические соединения,

которые имитируют свойства связывания антител с антигеном Nrp1) или их комбинации.

5 Было обнаружено, что антитело по настоящему изобретению связывается с уникальным эпитопом Nrp1A человека. Предпочтительно указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатками в области аминокислотных остатков 68-77 вклеточного домена Nrp1A человека, показанного как SEQ ID NO: 26.

10 В контексте связывания эпитопа фраза «связывается в аминокислотных областях XY...» означает, что анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с одним, предпочтительно со всеми аминокислотными остатками в пределах аминокислотной области со специфичной последовательностью.

15 Согласно другому объекту настоящего изобретения анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27. Предпочтительно анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с последовательностью SEQ ID NO: 27.

Терапевтические применения

20 Третий объект настоящего изобретения относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту для их применения в качестве лекарственного средства.

25 Как упоминалось ранее, Sema3A является природным лигандом NRP1. Точнее, Sema3A связывается с А-доменом Nrp1. В настоящем изобретении показано, что семафорин 3А секретируется гипоксическими ганглиозными клетками сетчатки в ишемизированной/аваскулярной сетчатке и действует в качестве вазорепульсивного сигнала. В настоящем изобретении подтверждено, что Sema3A действительно отталкивает новые сосуды от ишемической области, индуцируя коллапс цитоскелета в этих клетках, тем самым ингибируя
30 регенерацию сосудов сетчатки и усиливая патологическую преретинальную неоваскуляризацию.

Путем нацеливая на Nrp1, предпочтительно на А-домен Nrp1, антитело по настоящему изобретению предотвращает связывание Nrp1 и Sema3A. В настоящем изобретении показано, что модулирование вазорепульсивного

действия с помощью Nrp1A-антитела увеличивает количество концевых клеток и перенаправляет ангиогенез в сторону ишемических областей (пример б), таких как патологически увеличенная фовеальная аваскулярная зона у людей с диабетической макулярной ишемией.

5 В дополнение к предотвращению связывания А-домена Nrp1 и Sema3A, антитело по настоящему изобретению проявляет неожиданное свойство ингибировать проницаемость сетчатки, индуцированную VEGF, предпочтительно VEGF-A. Как упоминалось ранее, VEGF-A является природным лигандом В-домена Nrp1. Антитело по настоящему изобретению 10 нацелено на А-домен Nrp1, а не нацелено конкретно на связывание Nrp1B и VEGF-A. Однако в настоящем изобретении обнаружено, что данное антитело ингибирует проницаемость гемато-ретиального барьера, индуцированную VEGF-A. Не опираясь на какую-либо теорию, в настоящем изобретении высказано предположение, что ингибирование проницаемости сетчатки, 15 индуцированное VEGF-A антителом против А-домена Nrp1, предпочтительно антителом по настоящему изобретению, вызвано стерической интерференцией с сигнальным голорецепторным комплексом, состоящим из Nrp1, рецептора 2 VEGF и дополнительных корецепторов.

20 VEGF-A секретируется среди прочего гипоксическими астроцитами. VEGF-A является важным фактором в развитии как пролиферативной диабетической ретинопатии (ПДР), так и диабетического макулярного отека (ДМО), изменяя проницаемость капилляров сетчатки путем модулирования адгезионных соединений, таких как VE-кадгерин, или плотных соединений, таких как окклюдины. VEGF-A стимулирует эндотелиальные клетки к высвобождению 25 матриксных металлопротеиназ (ММП) и активатора плазминогена урокиназного типа, что приводит к деградации базальных мембран и делает возможной миграцию клеток.

30 Следовательно, секреция VEGF-A в условиях гипоксии является отягчающим фактором, так как способствует повышению проницаемости сетчатки, усугубляя макулярный отек. Кроме того, установлено, что и Sema3A, и VEGF-A способствуют повышению проницаемости сосудов путем связывания с Nrp1, что приводит к сосудистой утечке и, таким образом, способствует макулярному отеку.

В настоящем изобретении эта патологическая ситуация была разрешена путем создания антител, нацеленных на Nrp1A, что очень полезно для:

- перенаправления ангиогенеза в области ишемии для улучшения реваскуляризации сетчатки;

5 - предотвращения патологической неоваскуляризации области стекловидного тела;

- предотвращения разрушения гемато-ретиального барьера, индуцированного Sema3A;

10 - предотвращение разрушения гемато-ретиального барьера, индуцированного VEGF-A.

Таким образом, за счет сочетания двух неожиданных эффектов, антитело по настоящему изобретению оказывается очень полезным для:

- улучшения реваскуляризации ишемизированной аваскулярной области, как правило, сетчатки у пациентов с диагнозом ПДР, особенно ДМИ;

15 - предотвращения сосудистой утечки, вызванной секрецией Sema3A, как правило, у пациентов с диагнозом ПДР, особенно ДМО;

- предотвращения сосудистой утечки, вызванной секрецией VEGF-A, как правило, у пациентов с диагнозом ПДР, особенно ДМО.

20 Следовательно, настоящее изобретение относится к анти-Nrp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в лечении или профилактике заболеваний сетчатки или глаз.

25 Следует отметить, что антитело по настоящему изобретению не предотвращает связывание VEGF и Nrp1, как показано на фиг. 12. Антитело по настоящему изобретению не влияет на VEGF-индуцированный ангиогенез (поскольку антитело по настоящему изобретению не предотвращает VEGF-A-индуцированную пролиферацию эндотелиальных клеток) и влияет только на VEGF-A-индуцированную проницаемость сетчатки.

30 В настоящем изобретении показано, что антитело по настоящему изобретению не предотвращает пролиферацию эндотелиальных клеток, как показано в примере 13. Кроме того, показано, что антитело по настоящему изобретению не влияет на VEGF-индуцированный ангиогенез в анализе VEGF-индуцированного образования сети (пример 14).), а также при индуцированной лазером хориоидальной неоваскуляризации (пример 15). Таким образом, в

настоящем изобретении подтверждено, что антитело по настоящему изобретению не ингибирует ангиогенез, индуцированный VEGF-A.

В настоящем изобретении описано, что представляемое антитело ингибирует вазорепульсивное действие Sema3A, что позволяет перенаправлять ангиогенез к ишемическим областям. Кроме того, антитело по настоящему изобретению предотвращает разрушение гемато-ретиального барьера, вызванное как Sema3A, так и VEGF-A. Несмотря на его ингибирующее действие на проницаемость гемато-ретиального барьера, индуцированную VEGF-A, антитело по настоящему изобретению неожиданно не оказывает влияния на ангиогенез, индуцированный VEGF-A.

Кроме того, антитело по настоящему изобретению не препятствует реваскуляризации. Таким образом, не будет препятствия ангиогенезу ишемических областей. Следовательно, антитело по изобретению чрезвычайно полезно в клинической ситуации, когда необходимо стимулировать реваскуляризацию, например, для улучшения реваскуляризации ишемизированной аваскулярной области, как правило, в сетчатке пациентов с диагнозом пролиферативной диабетической ретинопатии (ПДР), особенно диабетической макулярной ишемии ДМИ.

Четвертый объект настоящего изобретения относится к анти-Nrp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в лечении или профилактике заболевания, выбранного из группы, состоящей из ретинопатии, пролиферативной ретинопатии, такой как ретинопатия недоношенных, ишемической ретинопатии, диабетической ретинопатии, в том числе пролиферативной диабетической ретинопатии и непролиферативной диабетической ретинопатии, диабетического макулярного отека, диабетической ишемии желтого пятна, возрастной дегенерации желтого пятна, пигментного ретинита, наследственной дистрофии сетчатки, миопической дегенерации, окклюзии вен сетчатки, окклюзии артерии сетчатки, эндофтальмита, увеита, цистоидного макулярного отека, хориоидальной неоваскулярной мембраны, вторичной по отношению к любым заболеваниям сетчатки, невротии зрительного нерва, глаукомы, отслойки сетчатки, токсической ретинопатии, радиационной ретинопатии, травматической ретинопатии, медикаментозной васкулопатии сетчатки, неоваскуляризации сетчатки, полипозной хориоидальной васкулопатии, васкулита сетчатки, микроаневризмы сетчатки,

дистрофии Фукса, макулярной телеангиэктазии, синдрома Ашера и болезни Штаргардта.

5 Анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению особенно полезно для лечения или профилактики диабетической ретинопатии, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, ишемическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, диабетическую макулярную ишемию, возрастной макулярный отек, неоваскуляризацию сетчатки и хориоидальную неоваскуляризацию.

10 В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения указанное заболевание представляет собой диабетическую макулярную ишемию, и антитело по настоящему изобретению способствует регенерации сосудов в ишемизированной сетчатке (реваскуляризации) и предотвращает патологическую неоваскуляризацию области стекловидного тела глаза.

15 В других предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения указанное заболевание представляет собой диабетический макулярный отек, и антитело по настоящему изобретению снижает проницаемость гемато-ретиального барьера, индуцированную Sema3A и VEGF-A.

20 В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение относится к анти-Nrp1A антителу или его антигенсвязывающему фрагменту для ингибирования Sema3A-индуцированной регрессии сосудов из областей ишемии, ингибирования Sema3A-индуцированной проницаемости гемато-ретиального барьера и ингибирования VEGF-A-индуцированной проницаемости гемато-ретиального барьера.

25 Используемые в настоящем изобретении выражения «ингибирование проницаемости гемато-ретиального барьера (BRB – blood retinal barrier)», «ингибирование проницаемости сетчатки» и «ингибирование сосудистой проницаемости» могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к разрушению гемато-ретиального барьера, что потенциально приводит к
30 сосудистой утечке. Указанная сосудистая утечка может быть индуцирована Sema3A, с одной стороны, и VEGF, предпочтительно VEGF-A, с другой стороны. В настоящем изобретении разработано антитело, которое может ингибировать проницаемость BRB, индуцированную Sema3A, а также ингибировать проницаемость BRB, индуцированную VEGF-A. Таким образом, антитело по

настоящему изобретению предотвращает разрушение гемато-ретиального барьера и предотвращает нарушение целостности клеток сетчатки, вызванную Sema3A и/или VEGF-A.

5 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению применимо для лечения диабетического макулярного отека (ДМО) и/или диабетической макулярной ишемии (ДМИ). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению применимо для лечения пациента с диагнозом ДМО и ДМИ. Предпочтительно антитело по настоящему изобретению используют для 10 лечения ДМИ, которое выражается увеличением фовеальной аваскулярной зоны (ФАЗ) более чем на 15%, 20%, 25% и, более предпочтительно, более чем на 30%.

Показано, что настоящее изобретение чрезвычайно полезно для пациентов как с диагнозом ДМИ, так и ДМО, поскольку антитело по настоящему изобретению ингибирует проницаемость сетчатки, индуцированную VEGF-A, не 15 влияя на проангиогенные эффекты, которые VEGF-A может оказывать на регенерацию сосудов в ишемизированной сетчатке.

Согласно пятому объекту настоящее изобретение представляет фармацевтическую композицию, содержащую анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

20 Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят любым подходящим способом, включая интравитреальное, пероральное, парентеральное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрилегочное и интраназальное введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. 25 Кроме того, анти-Nrp1A-антитело целесообразно вводить путем импульсной инфузии, в частности, с уменьшающимися дозами антитела. В одном объекте дозирование производят с помощью инъекций, чаще всего внутривенных или подкожных инъекций, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или длительным. Предпочтительно анти-Nrp1A антитело 30 вводят путем интравитреальной инъекции в глаз.

Для профилактики или лечения заболевания соответствующая доза антитела может зависеть от множества факторов, таких как тип заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, тяжести и течения заболевания, вводят ли антитело для профилактики или в терапевтических целях, предыдущей

терапии, истории болезни пациента и реакции на антитела, а также учитывают мнение лечащего врача. Антитело подходящим образом вводят пациенту за один раз или в течение серии обработок.

5 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения диапазон доз антител по настоящему изобретению в расчете на инъекцию обычно составляет от 1 мг/глаз до 10 мг/глаз, предпочтительно от 1,5 мг/глаз до 5 мг/глаз, более предпочтительно от 2 мг/глаз до 3 мг/глаз и еще более предпочтительно примерно 2,5 мг/глаз.

10 Термин «подавление» используют в настоящем изобретении в том же контексте, что и «улучшение» и «облегчение», для обозначения ослабления или понижения проявления одного или нескольких признаков заболевания.

15 Композицию антитела составляют, дозируют и вводят в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в этом контексте, включают конкретное подвергаемое лечению заболевание, конкретное подвергаемое лечению млекопитающее, клиническое состояние конкретного пациента, причину расстройства, место для доставки агента, способ введения, график введения и другие факторы, известные практикующим врачам. «Терапевтически эффективное количество» вводимого антитела будет определяться такими перечисленными выше обстоятельствами и представляет 20 минимальное количество, необходимое для предотвращения, облегчения или лечения заболеваний глаз или сетчатки, на которые направлено антитело по настоящему изобретению.

25 Антитело не обязательно должно быть составлено с одним или несколькими агентами, используемыми в настоящее время для профилактики или лечения анализируемого расстройства. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества анти-Ngp1A-антитела, присутствующего в составе, типа расстройства или от лечения и других факторов, обсуждавшихся выше. Их обычно применяют в тех же дозировках и вводят теми же способами введения, что и ранее, или примерно от 1 до 99% от ранее использовавшихся 30 дозировок.

Способ лечения

В другом объекте настоящего изобретения также предусматривают любой способ лечения или профилактики глаз или заболеваний глаз у нуждающегося в

этом пациента, который включает введение анти-Nrp1A-антитела по настоящему изобретению.

Предпочтительно настоящее изобретение относится к способу применения антитела по настоящему изобретению для ингибирования вазорезпрессивного действия SemaA3. Более предпочтительно настоящее изобретение относится к 5 указанному способу улучшения реваскуляризации сетчатки.

Предпочтительно настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболеваний глаз или сетчатки, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, фармацевтически эффективного количества антитела по 10 настоящему изобретению. Предпочтительно указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из ретинопатии, пролиферативной ретинопатии, такой как ретинопатия недоношенных, ишемической ретинопатии, диабетической ретинопатии, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетического макулярного 15 отека, диабетической макулярной ишемии, возрастной макулярной дегенерации, пигментного ретинита, наследственной дистрофии сетчатки, миопической дегенерации, окклюзии вен сетчатки, окклюзии артерии сетчатки, эндофтальмита, увеита, кистозного макулярного отека, хориоидальной неоваскулярной мембраны, вторичной по отношению к любым заболеваниям 20 сетчатки, нейропатии зрительного нерва, глаукомы, отслойки сетчатки, токсической ретинопатии, лучевой ретинопатии, травматической ретинопатии, медикаментозной васкулопатии сетчатки, неоваскуляризации сетчатки, полипоидной хориоидальной васкулопатии, васкулита сетчатки, микроаневризма сетчатки, дистрофии Фукса, макулярной телеангиэктазии, синдрома Ашера и 25 болезни Штаргардта. Более предпочтительно, указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из диабетической ретинопатии, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, ишемической ретинопатии, диабетического макулярный отек, диабетической макулярной ишемии, возрастного макулярного отека, 30 неоваскуляризации сетчатки, глаукомы и хориоидальной неоваскуляризации. В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанное заболевание представляет собой диабетический макулярный отек и/или диабетическую макулярную ишемию.

Все описанные в настоящем изобретении технические свойства применимы к указанному способу лечения.

Фармацевтические композиции и их введение

Композицию, включающую анти-Nrp1A антитело или его
5 антигенсвязывающий фрагмент, можно вводить субъекту с болезнью глаз или сетчатки или с риском их развития. Настоящее изобретение дополнительно предусматривает применение анти-Nrp1A антитела или его
10 антигенсвязывающего фрагмента для получения лекарственного средства для профилактики или лечения заболевания, связанного с Nrp1A. Термин «субъект», используемый в настоящем изобретении, означает любого пациента из класса млекопитающих, которому можно вводить анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; к таким пациентам могут относиться, например, люди и другие млекопитающие, такие как приматы, грызуны и собаки.
15 Субъекты, особенно предназначенные для лечения с использованием описанных в настоящем изобретении способов, включают людей. Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить отдельно или в комбинации с другими композициями.

Известны различные системы введения, которые можно использовать для введения анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.
20 Способы введения включают, но не ограничиваются ими, интравитреальный путь, глазные капли, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить, например, путем инфузии, болюсно или инъекцией, причем можно вводить
25 вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения введение осуществляют инъекцией в стекловидное тело. Составы для таких инъекций могут быть приготовлены, например, в заранее заполненных шприцах.

30 В типичных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическую композицию готовят в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного или подкожного введения человеку. Обычно композиции для введения путем инъекции представляют собой растворы в стерильном

изотоническом водном буфере. При необходимости фармацевтический препарат может также включать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляют либо по отдельности, либо смешивают вместе в единой дозированной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если фармацевтический препарат следует вводить путем инфузии, его можно вводить с применением флакона для инфузий, содержащего стерильную воду фармацевтического качества или физиологический раствор. Если лекарство вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, чтобы можно было смешать ингредиенты перед введением.

Кроме того, фармацевтическая композиция может быть представлена в виде фармацевтического набора, включающего (а) контейнер, содержащий анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в лиофилизированной форме, и (б) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или разведения лиофилизированного анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Необязательно с таким контейнером (контейнерами) может быть уведомление в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических или биологических продуктов, которое подтверждает одобрение агентства по производству, использованию или продаже для введения человеку.

Количество анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое является эффективным для лечения или профилактики заболеваний глаз или сетчатки, можно определить стандартными клиническими методами. Кроме того, необязательно можно использовать анализы *in vitro*, чтобы помочь определить оптимальные диапазоны дозировок. Точная доза, содержащаяся в препарате, также будет зависеть от способа введения и стадии расстройства и ее следует определять в соответствии с мнением лечащего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы могут быть

экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных в тест-системах *in vitro* или на животных моделях.

Например, токсичность и терапевтическую эффективность анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента можно определить в культурах клеток или на экспериментальных животных с помощью стандартных фармацевтических процедур определения ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции). Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые обладают большим терапевтическим индексом, являются предпочтительными.

Данные, полученные в результате анализа клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при определении диапазона дозировок для применения у людей. Дозировка анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает ED₅₀ с небольшой токсичностью или без токсичности. Дозировка может варьировать в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого способа введения. Для любого анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, используемого в способе по настоящему изобретению, терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена на основании анализов клеточных культур. Доза может быть составлена на животных моделях для достижения диапазона концентраций в циркулирующей плазме, который включает IC₅₀ (т.е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигают половины максимального ингибирования симптомов), как определено в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения полезных доз для человека. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, ELISA и т.п.

В случае внутривитреальных инъекций анти-Nrp1A антитела предпочтительно увеличивать интервалы между введениями. Из-за усиленной активности анти-Nrp1A антитела по настоящему изобретению его можно вводить с увеличенными интервалами.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-Nrp1A антитело вводят каждые 6 недель, предпочтительно каждые 7 недель, предпочтительно каждые 8 недель, предпочтительно каждые 9 недель,

предпочтительно каждые 10 недель, предпочтительно каждые 11 недель и особенно предпочтительно каждые 12 недель. В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению вводят один раз каждые 3 месяца.

5 Поскольку объем, который можно вводить в глаз, строго ограничен, очень важно, чтобы анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению можно было приготовить в высокой концентрации. Кроме того, активность анти-Nrp1A антитела имеет большое значение, поскольку сильное антитело может оказывать свое действие даже при более низких дозах и, таким образом, продлевать
10 активность, а также интервалы между введениями.

 Антитела по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде очень высоких доз, которые включают, но не ограничиваются ими, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл или 100 мг/мл. Предпочтительно антитела по настоящему изобретению могут быть
15 приготовлены в виде жидкого состава с концентрацией примерно 50 мг/мл.

 Типичная доза, которую можно вводить пациенту, составляет примерно 2,5 мг/глаз. Типичные буферные компоненты, которые можно использовать для такой композиции, включают, например, ацетат натрия, PS20 и дигидрат трегалозы.

20 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-Nrp1A антитело перерабатывают с 10 мМ гистидиновым буфером, 240 мМ сахарозой, 0,02 мас.% полисорбатом 20 с рН 5,5 с конечной концентрацией белка 60 мг/мл.

 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции, содержащие анти-Nrp1A антитело или его
25 антигенсвязывающий фрагмент, могут дополнительно содержать терапевтический агент, либо конъюгированный, либо неконъюгированный со связывающим агентом.

 Что касается терапевтических схем комбинированного введения, то в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения анти-Nrp1A
30 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят одновременно с терапевтическим агентом. В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтический агент вводят до или после введения анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, по меньшей мере, за час и до нескольких месяцев, например, по меньшей мере, за час, 5 ч, 12

ч, сутки, неделю, месяц или три месяца до или после введения анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и методы рекомбинации

Шестой объект настоящего изобретения охватывает выделенные
5 полинуклеотиды, которые содержат последовательность, кодирующую анти-Nrp1A антитело, векторы и клетки-хозяева, содержащие полинуклеотиды, а также рекомбинантные методы получения антитела. Выделенные полинуклеотиды могут кодировать любую желаемую форму анти-Nrp1A антитела, включая, например, моноклональные антитела полной длины,
10 фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

Полинуклеотид (полинуклеотиды), которые содержат последовательность, кодирующую анти-Nrp1A антитело, или его фрагмент, или цепь, могут быть
15 слиты с одной или несколькими регуляторными или контрольными последовательностями, что известно в данной области, и могут содержаться в подходящих векторах экспрессии или клетках-хозяевах, что также известно в данной области техники. Каждая из полинуклеотидных молекул, кодирующих переменные домены тяжелой или легкой цепи, может быть независимо слита с
20 полинуклеотидной последовательностью, кодирующей константный домен, такой как константный домен человека, что позволяет получать интактные антитела. В другом варианте полинуклеотиды или их части могут быть слиты вместе, обеспечивая матрицу для получения одноцепочечного антитела.

Для получения методом рекомбинации полинуклеотид, кодирующий
25 антитело, встраивают в реплицируемый вектор для клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. Доступны многие подходящие векторы для экспрессии рекомбинантного антитела. Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваются ими, одну или несколько из следующих последовательностей: сигнальную последовательность, точку начала
30 репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

α Anti-Nrp1A антитело также может быть получено в виде слитых полипептидов, в которых антитело слито с гетерологичным полипептидом, таким как сигнальная последовательность или другой полипептид, имеющий

специфический сайт расщепления на аминоконце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность обычно распознается и обрабатывается (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не обрабатывают сигнальную последовательность анти-Nrp1A антитела, 5 сигнальная последовательность может быть замещена прокариотической сигнальной последовательностью. Сигнальная последовательность может быть, например, щелочной фосфатазой, пенициллиназой, липопротеином, лидерами термостабильного энтеротоксина II и т.п. Для секреции в дрожжах нативная 10 сигнальная последовательность может быть заменена, например, лидерной последовательностью, полученной из альфа-фактора инвертазы дрожжей (включая лидеры альфа-фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*), кислой фосфатазы, глюкоамилазы *C. albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в WO90/13646. В клетках млекопитающих можно использовать 15 сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, сигнал gD простого герпеса. ДНК такой области-предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей гуманизированное анти-Nrp1A антитело.

Векторы экспрессии и клонирования содержат последовательность 20 нуклеиновой кислоты, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. Как правило, в векторах клонирования эта последовательность представляет собой последовательность, которая позволяет вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина и включает точки начала репликации или автономно реплицирующиеся 25 последовательности. Такие последовательности хорошо известны для множества бактерий, дрожжей и вирусов. Начало репликации из плазмиды pBR322 применимо для большинства грамотрицательных бактерий, начало репликации плазмиды 2-*u* можно использовать для дрожжей, а различные начала репликации вирусов (SV40, полиомы, аденовируса, VSV и BPV) пригодны для клонирования 30 векторов в клетках млекопитающих. Обычно компонент начала репликации не требуется для векторов экспрессии в млекопитающих (обычно можно использовать начало репликации вируса SV40 только потому, что он содержит ранний промотор).

Векторы экспрессии и клонирования могут содержать ген, кодирующий селективный маркер для облегчения идентификации экспрессии. Типичные гены селективных маркеров кодируют белки, которые придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, или, в другом варианте, дополняют ауксотрофную недостаточность, или, в еще одном варианте, обеспечивают определенные питательные вещества, которых нет в сложных средах, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для *Bacilli*.

В одном примере схемы селекции используют лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформируются гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий лекарственную устойчивость, и, таким образом, выживают в режиме селекции. В примерах такой доминантной селекции используют препараты неомицин, микофеноловую кислоту и гигромицин. Обычными селективными маркерами для клеток млекопитающих являются маркеры, которые позволяют идентифицировать клетки, способные поглощать нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизированное анти-Nrp1A антитело, например, DHFR (дигидрофолатредуктаза), тимидинкиназа, металлотioneин-I и -II (например, гены металлотioneина приматов), аденозиндезаминаза, орнитиндекарбоксилаза и т.п. Клетки, трансформированные селективным геном DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Подходящей клеткой-хозяином при использовании DHFR дикого типа является линия клеток яичника китайского хомячка (CHO – Chinese hamster ovary), дефицитная по активности DHFR (например, DG44).

В другом варианте клетки-хозяева (в частности, хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR) трансформируют или котрансформируют последовательностями ДНК, кодирующими анти-Nrp1 антитело, белок DHFR дикого типа и другой селективный маркер, такой как аминогликозид-3'-фосфотрансфераза (APH – aminoglycoside 3'-phosphotransferase), могут быть отобраны путем роста клеток в среде, содержащей селективный агент для селектируемого маркера, такой как аминогликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См., например, US 4965199.

Когда продукт получают в результате рекомбинации в дрожжевой клетке в качестве клетки-хозяина, ген TRP1, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb с соавт., *Nature*, 1979, 282: 39), может быть использован в качестве селективируемого маркера. Ген TRP1 обеспечивает селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, лишенного способности расти на триптофане, например, ATCC № 44076 или PEP4-1 (Jones, 1977, *Genetics*, 1977, 85:12). Наличие повреждения *trp1* в геноме дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективную среду для обнаружения трансформации путем роста в отсутствие триптофана. Сходным образом *Leu2p*-недостаточные штаммы дрожжей, такие как ATCC 20622 и 38626, дополняются известными плазмидами, несущими ген LEU2.

Кроме того, векторы, полученные из кольцевой плазмиды pKD1 размером 1,6 мкм, можно использовать для трансформации дрожжей *Kluyveromyces*. В другом варианте сообщалось о системе экспрессии для крупномасштабного производства рекомбинантного химозина телячьего для *K. lactis* (Van den Berg, *Bio/Technology*, 1990, 8:135). Также были описаны стабильные мультикопийные векторы экспрессии для секреции зрелого рекомбинантного сывороточного альбумина человека промышленными штаммами *Kluyveromyces* (Fleeg с соавт., *Bio/Technology*, 1991, 9:968-975).

Векторы экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей анти-Nrp1A антитело или его полипептидную цепь. Промоторы, применимые для использования с прокариотическими хозяевами, включают промотор *rhoA*, промоторные системы β -лактамазы и лактозы, щелочную фосфатазу, промоторную систему триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac*. Также подходят другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для применения в бактериальных системах также могут содержать последовательность Шайна-Дальгамо (S.D. – Shine-Dalgarno), функционально связанную с ДНК, кодирующей гуманизованное анти-Nrp1A антитело.

Известно много последовательностей эукариотических промоторов. Практически все эукариотические гены имеют АТ-богатую область, расположенную примерно на 25–30 нуклеотидов выше по цепи от сайта инициации транскрипции. Другая последовательность, обнаруженная на 70-80

оснований выше начала транскрипции многих генов, представляет собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может служить сигналом для добавления поли-А-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности соответствующим образом встраиваются в эукариотические векторы экспрессии.

Примеры подходящих последовательностей промоторов для использования с клетками-хозяевами дрожжей включают промоторы 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа.

Индукцибельные промоторы имеют дополнительное преимущество, заключающееся в том, что транскрипция контролируется условиями роста. К ним относятся области промоторов дрожжей для алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, производных ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Энхансеры дрожжей также преимущественно используют с дрожжевыми промоторами.

Транскрипция анти-Nrp1A антитела с векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (например, аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и обезьяний вирус 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, промотора актина или промотора иммуноглобулина, или промоторов теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 удобно получать в виде фрагмента рестрикции SV40, который также содержит начало репликации вируса SV40. Немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде фрагмента рестрикции HindIII E. Система для экспрессии ДНК в клетках-хозяевах млекопитающих с использованием вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора описана в US 4419446. Модификация этой

системы описана в US 4601978. См. также публикацию Reyes с соавт., *Nature*, 1982, 297:598-601, в которой описывают экспрессию кДНК р-интерферона человека в клетках мыши под контролем промотора тимидинкиназы вируса простого герпеса. В другом варианте в качестве промотора можно использовать
5 длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

Другим полезным элементом, который можно использовать в рекомбинантном векторе экспрессии, является энхансерная последовательность, которую используют для увеличения транскрипции ДНК, кодирующей анти-Ngr1A антитело, высшими эукариотами. Многие энхансерные
10 последовательности в настоящее время известны в генах млекопитающих (например, глобин, эластаза, альбумин, α -фетопротеин и инсулин). Однако обычно используют энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают энхансер SV40 на поздней стороне начала репликации (п.н. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на удаленной
15 стороне от начала репликации и энхансеры аденовируса. См. также публикацию Yaniv, *Nature*, 1982, 297:17-18 для описания элементов-энхансеров для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в векторе в положении 5' или 3' по отношению к последовательности, кодирующей анти-Ngr1A антитело, но предпочтительно при этом он расположен на 5'-конце
20 от промотора.

Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (клетках дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или клетках других многоклеточных организмов, содержащих ядра), также могут
25 содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5'- и иногда 3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей анти-Ngr1A антитело. Одним из полезных компонентов терминации
30 транскрипции является область полиаденилирования гормона роста быка. См. Заявку WO 94/11026 и описанный в ней вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-Ngr1A антитела могут быть экспрессированы с помощью применения системы CHEF (см., например,

патент US 5888809, сущность которого включена в настоящее изобретение в виде ссылки).

Соответствующими клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах по настоящему изобретению являются клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот, описанные выше. К соответствующим прокариотам для решения такой задачи являются эубактерии, как грамотрицательные, так и грамположительные, например, из семейства *Enterobacteriaceae*, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также бациллы, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis* (например, штамм *B. licheniformis* 41 P, описанный в DD 266710, опубликованном 12 апреля 1989 г.), *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*. Одним из предпочтительных хозяев для клонирования *E. coli* является *E. coli* 294 (ATCC 31446), хотя подходят и другие штаммы, такие как *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31537) и *E. coli* W3110 (ATCC 27325). Эти примеры являются иллюстрациями настоящего изобретения, но не ограничивают области его охвата.

Помимо прокариот, хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела против Nrp1A, могут быть эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, наиболее часто используются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако ряд других родов, видов и штаммов обычно доступны и применимы в настоящем документе, например, *Schizosaccharomyces pombe*; представители рода *Kluyveromyces*, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, например, *Schwanniomyces occidentalis*; и мицелиальные грибы, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* и *Aspergillus*, например, *A. nidulans* и *A. niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного анти-Nrp1A антитела получают из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых, в том числе, например,

многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты и соответствующие перmissive клетки-хозяева насекомых от таких хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая муха) и *Bombyx mori* (шелковый червь). Различные вирусные штаммы для трансфекции общедоступны, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV, причем такие вирусы можно использовать, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Культуры клеток таких растений, как хлопок, кукуруза, картофель, соя, петунии, помидоры и табак, также можно использовать в качестве культур клеток-хозяев.

Анти-Nrp1A антитело по настоящему изобретению также может быть включено в вирусные векторы, т.е. полинуклеотид, кодирующий анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят в вирусный вектор и затем экспрессируют в организме пациента после инфицирования вирусом.

В другом объекте экспрессию анти-Nrp1A антитела осуществляют в клетках позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) стало рутинной процедурой, а методы широкодоступны. Примерами применимых в качестве клеток-хозяев клеточных линий млекопитающих являются линия почки обезьяны CV1, трансформированная вирусом SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), линия почки эмбриона человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в культуре в виде суспензии, (Graham с соавт., *J. Gen Virol.*, 1977, 36: 59), клетки почки детеныша хомячка (ВНК, ATCC CCL 10), клетки яичника китайского хомячка/-DHFR1 (CHO, Urlaub с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77: 4216; например, DG44), клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 1980, 23:243-251), клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70), клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587), клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2), клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34), клетки печени серой крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442), клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75), клетки печени человека (Hep G2, HB 8065), клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51), клетки TR1 (Mather с соавт., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1982, 383: 44-68), клетки MRC 5, клетки FS4 и линия клеток гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют описанными выше экспрессирующими или клонирующими векторами для получения анти-Nrp1A антител и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих нужные последовательности.

Клетки-хозяева, используемые для получения описанного в настоящем изобретении анти-Nrp1A антитела, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (фирма Sigma-Aldrich Co., Сент-Луис, Миссури), Minimal Essential Medium ((MEM), (фирма Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (фирма Sigma-Aldrich Co.) и среда Игла в модификации Дульбекко ((DMEM), фирма Sigma-Aldrich Co.) пригодна для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любые среды, описанные в одной или нескольких из работ Нам с соавт., *Meth. Enz.*, 1979, 58: 44; Barnes с соавт., *Anal. Biochem.*, 1980, 102: 255; US 4767704, US 4657866, US 4927762, US 4560655, US 5122469, WO 90/103430 и WO 87/00195, могут применяться в качестве культуральных сред для клеток-хозяев. Любая из этих сред при необходимости может быть дополнена гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфатом), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как гентамицин), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующими в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Другие добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, известных специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются теми, которые ранее использовались клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и они известны специалистам в данной области.

При использовании рекомбинантных методов антитело может быть получено внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно секретировано в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, клетки могут быть разрушены для высвобождения белка в качестве первой стадии. Частицы мусора, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, можно удалить, например, центрифугированием или

ультрафильтрацией. Carter с соавт., *Bio/Technology*, 1992, 10:163-167 описывают процедуру выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную пасту оттаивают в присутствии ацетата натрия (рН 3,5), ЭДТА и фенилметилсульфонилфторида (PMSF – phenylmethylsulfonylfluoride) в течение примерно 30 мин. Остатки клеток можно удалить центрифугированием. Когда антитело секретируется в среду, надосадочные жидкости из таких систем экспрессии обычно сначала концентрируют с использованием имеющегося в продаже фильтра для концентрирования белков, например, ультрафильтрационной установки Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен на любой из вышеперечисленных стадий для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста посторонних контаминантов. Для выделения антитела из клеток-хозяев можно пользоваться различными методами.

Композицию антител, полученную из клеток, можно очистить, используя, например, хроматографию на гидроксипатите, гель-электрофорез, диализ и аффинную хроматографию, причем аффинная хроматография является типичным методом очистки. Применимость белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого домена Fc иммуноглобулина, присутствующего в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, основанных на тяжелых цепях гамма1, гамма2 или гамма4 человека (см., например, Lindmark с соавт., *J. Immunol. Meth.*, 1983, 62:1-13). Белок G рекомендуют для всех изоформ мышей и для гамма3 человека (см., например, Guss с соавт., *EMBO J.*, 1986, 5:1567-1575). Матрица, с которой соединен аффинный лиганд, чаще всего является агарозой, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с регулируемым порами или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокую скорость потока и более короткое время обработки, чем при использовании агарозы. Если антитело содержит домен C_{H3}, для очистки можно использовать смолу BAKERBOND ABX™ (фирма J.T. Baker, Филлипсбург, Нью-Джерси). Другие методы очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарине SEPHAROSE™, хроматография на анионообменной или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой),

хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония также доступны в зависимости от восстанавливаемого антитела.

После любой предварительной стадии (стадий) очистки смесь, содержащая представляющее интерес антитело и примеси, может быть подвергнута
5 хроматографии с гидрофобным взаимодействием при низком рН с использованием элюирующего буфера при рН примерно 2,5-4,5, обычно выполняемой при низких концентрациях соли (например, от около 0-0,25 М соли).

Также включены нуклеиновые кислоты, которые гибридизируются в
10 условиях низкой, средней и высокой строгости, как определено в настоящем изобретении, со всей или частью (например, частью, кодирующей переменную область) нуклеотидной последовательности, представленной выделенной полинуклеотидной последовательностью (последовательностями), которая кодирует анти-Nrp1A антитело или фрагмент антитела. Гибридирующая часть
15 гибридирующейся нуклеиновой кислоты обычно состоит по меньшей мере из 15 (например, 20, 25, 30 или 50) нуклеотидов в длину. Гибридирующая часть гибридирующейся нуклеиновой кислоты идентична по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% последовательности части или всей нуклеиновой кислоты,
20 кодирующей анти-Nrp1A полипептид (например, переменная область тяжелой цепи или легкой цепи) или комплементарной ему последовательности. Гибридируемые нуклеиновые кислоты описанного в настоящем изобретении типа, можно использовать, например, в качестве зонда для клонирования, праймера, например, праймера для ПЦР, или диагностического зонда.

25 В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду или полинуклеотидам, содержащим последовательность, кодирующую тяжелую цепь, представленную как SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, или переменная область тяжелой цепи,
30 представленную как SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; и последовательность, кодирующую легкую цепь, представленную как SEQ ID NO: 19, или переменную область легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 11.

Следует учитывать, что в указанных анти-Nrp1A антителах и фрагментах антител последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CDR, остается неизменной (неизменной в отношении аминокислоты, которую они кодируют, возможны эквиваленты последовательности ДНК из-за вырожденности кода), но окружающие области, например области FR, могут быть сконструированы.

Получение изделий

В другом объекте настоящего изобретения содержатся материалы, полезные для лечения описанных выше нарушений. Изделие включает контейнер и этикетку. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая эффективна для лечения состояния, и может иметь стерильный порт доступа. Например, контейнер может быть пакетом для внутривенного раствора или флаконом с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Активный агент в композиции является анти-Nrp1A антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Этикетка на контейнере с композицией или вкладыш используют для лечения определенного состояния. Получаемое изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера или раствор декстрозы. Кроме того, контейнер также может включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листы-вкладыши с инструкциями по применению.

Настоящее изобретение далее описано в примерах, которые не предназначены для ограничения объема изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Активация Sema3A в стекловидном теле у пациентов с ДМО и ПДР

Экспрессию Sema3A в сетчатке образцов от доноров-людей с диабетической ретинопатией в анамнезе исследуют с помощью иммуногистохимии. Протокол иммуноокрашивания заключается в следующем:

1. Разморозьте предметные стекла и дайте образцам высохнуть на воздухе в течение 30 минут при комнатной температуре;
2. Обведите маркером rap rep границу вокруг образца и дайте подсохнуть;

3. Восстановление антигена производят в 1% SDS в течение 5 мин при комнатной температуре;
4. Промыть стекла с препаратами 3 раза в ФСБ в течение 5 мин;
5. Блокировать срезы в растворе 1% БСА/0,3% Triton X100/ФСБ (блокирующем растворе) в течение 30 мин при комнатной температуре;
6. Развести 1-е кроличье анти-Sema3a антитело (Фирма Abscam, номер в каталоге ab23393) 1:200 в блокирующем растворе. Инкубировать срезы на стекле при комнатной температуре в течение ночи;
7. Промыть стекла со срезами 3 раза в ФСБ в течение 5 мин;
10. 8. Инкубировать со 2-м антителом, а именно ослиным анти-кроличьим Alexa fluor546 (фирма Invitrogen, номер в каталоге A10040) в разведении 1:400 в растворе DAPI/0,3% Triton X100/ФСБ. Инкубировать срезы на стеклах в течение 3 ч при комнатной температуре;
9. Промыть предметные стекла 3-5 раз в ФСБ в течение 5 мин;
15. 10. Накрыть срезы покровным стеклом Aquamount и дать подсохнуть на воздухе;
11. Просмотреть срезы и определить степень интенсивности при 40-кратном увеличении.

Наборы из трех срезов от каждого человека-донора подвергают иммуноокрашиванию для выявления Sema3A. Окрашивание Sema3A независимо оценивают в каждой из этих образцов наблюдателями, предварительно обученными для этой конкретной задачи, с использованием 5-бальной схемы оценки (0 = не обнаружен, 1 = низкая интенсивность, несколько пятен, 2 = умеренная интенсивность, несколько пятен, 3 = яркая интенсивность, обширное окрашивание, 4 = очень яркая интенсивность, обильное проявление).

Наблюдатели не знают о состоянии здоровья доноров этих исследуемых глаз. В сетчатке Sema3A связан с сосудистой стенкой кровеносных сосудов сетчатки. Экспрессия Sema3A в сосудах сетчатки и паренхиме сетчатки повышена у пациентов с диабетическим макулярным отеком по сравнению с диабетиками без

30 глазной патологии (фиг. 1).

Пример 2. Ингибирование VEGF-индуцированной проницаемости

Проницаемость измеряют в сетчатке серых крыс. Рекомбинантный VEGF-А человека (250 нг/2,5 мкл) вводят интравитреально, чтобы вызвать гиперпроницаемость. Антитела вводят одновременно с VEGF. Краситель Evans

Blue (45 мг/мл) вводят внутривенно через 24 ч после обработки VEGF в среднюю каудальную вену (1 мл/кг). Глаза удаляют через 30 мин и фиксируют в формалине. Готовят плоский препарат сетчатки и измеряют флуоресценцию Evans Blue при 620 нм с использованием конфокального флуоресцентного микроскопа и программного обеспечения для анализа изображений.

Результаты представлены на фиг. 2. Антитело по настоящему изобретению полностью ингибирует проницаемость, индуцированную VEGF. Это сходно с результатами, наблюдаемыми с афлиберцептом-ловушкой VEGF (продукт Eylea®). Антитело против семафорина 3А, являющегося лигандом Nrp1, не ингибирует индуцированную VEGF-А проницаемость сетчатки. Это подтверждает, что антитело по настоящему изобретению, направленное против А-домена Nrp1, ингибирует опосредованные VEGF-А эффекты и что эта способность отличает его от антитела, направленного против семафорина 3А, являющегося лигандом Nrp1. В настоящем изобретении показано, что антитело, направленное против Sema3А, полностью ингибирует проницаемость, индуцированную Sema3А, но не ингибирует проницаемость, индуцированную VEGF-А. В настоящем изобретении высказано предположение, что ингибирование индуцированной VEGF-А проницаемости сетчатки антителом против А-домена Nrp1 вызвано стерическим вмешательством в сигнальный голорецепторный комплекс, состоящий из Nrp1, VEGF-рецептора 2 и дополнительных ко-рецепторов.

Пример 3. Получение анти-Nrp1А- и анти-Nrp1В-антител с целью сравнения

Для сравнения в настоящем изобретении были разработаны антитела, направленные против Nrp1А и Nrp1В, соответственно, как описано в WO2008143666 и WO2007056470. К таким антителам относятся:

- антитело, направленное против Nrp1А, обозначаемое «YW64.3», и
- антитело, направленное против Nrp1В, обозначаемое «YW107.4.87».

Анти-Nrp1А антитело, обозначенное как клон «YW64.3» в патенте WO2007056470, обладает следующими свойствами:

- вариабельный домен тяжелой цепи представляет собой последовательность под номером 4 в WO2007056470, и
- вариабельный домен легкой цепи представляет собой последовательность под номером 3 в WO2007056470.

Анти-Nrp1B антитело, обозначенное как клон «YW107.4.87» в патенте WO2007056470, обладает следующими свойствами:

- тяжелая цепь представляет собой последовательность под номером 6 в WO2007056470, и

5 - легкая цепь представляет собой последовательность под номером 5 в WO2007056470.

Последовательности YW64.3 и YW107.4.87 суммированы следующим образом в табл. 6 ниже.

Таблица 6

Обозначение	Последовательность	SEQ ID NO:
YW64.3-HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPIWVRQAPGKGLEWV SSITGKNGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWGKQVYGMQVWVGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 28
YW64.3-LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSRASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYMSVPITFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 29
YW64.3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPIWVRQAPGKGLEWV SSITGKNGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWGKQVYGMQVWVGGTLVTVSS	SEQ ID NO: 30
YW64.3-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSRASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYMSVPITFG QGTKVEIKR	SEQ ID NO: 31
YW107.4.87- HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSQISPAGGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CARGELPYRMSKVMQVWVGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 32
YW107.4.87- LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYFSSYLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSRASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLGSPPTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 33
YW107.4.87- VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSYAMSWVRQAPGKGLEW SQISPAGGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARELPYRMSKVMQVWVGGTLVTVSS	SEQ ID NO: 34
YW107.4.87- VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYFSSYLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSRASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLGSPPTFG QGTKVEIKR	SEQ ID NO: 35

Пример 4. Анализ коллапса цитоскелета, индуцированного Sema3A – эффективность антитела по настоящему изобретению в отношении индуцированного Sema3A снижения импеданса и сравнение между антителом по настоящему изобретению и клонами YW64.3 и YW107.4.87.

5 Клеточную активность антител к Nrp1 оценивают по измерению коллапса цитоскелета в эндотелиальных клетках микрососудов сетчатки человека (HRMEC – human retinal microvascular endothelial cells) с использованием системы XCELLigence (приборы для анализа клеток в реальном времени (Real Time Cell Analysis Instruments), фирма ACEA Biosciences). Система измеряет
10 прикрепление, слияние и целостность клеток с помощью клеточного импеданса. Клетки HRMEC эндогенно экспрессируют нейропилин-1 (Nrp1) и плексины, которые являются компонентами голорецептора семафорина класса 3. Связываясь с этим рецепторным комплексом, семафорины вызывают коллапс волокон F-актина в эндотелии. В этом функциональном анализе добавление
15 рекомбинантного белка Sema3A к слою достигших слияния эндотелиальных клеток микрососудов сетчатки человека снижает клеточный импеданс из-за коллапса цитоскелета и последующего сморщивания клеток, измеряемого как снижение клеточного импеданса.

Вкратце, E-пластинки покрыты фактором прикрепления. Клетки высевают с
20 плотностью 20000 клеток на лунку, а затем оставляют расти в виде монослоя в нормальных условиях роста внутри устройства XCELLigence в течение ночи. Sema3A с комбинациями антител Nrp1 и без них добавляют в присутствии 3 мМ CaCl₂. Клеточный индекс нормализуют по моменту времени, предшествующему добавлению веществ. Расчеты проводят через 5 ч после стимуляции.

25 Для определения функциональной активности и сравнения образцов антител по настоящему изобретению (клон I, имеющий последовательность, изображенную в SEQ ID NO: 10 как VH, и последовательность, изображенную в SEQ ID NO: 11 как VL), клонов YW64.3 и YW107.4.87 и антитела, направленного против Sema3A в анализе коллапса цитоскелета, кривые
30 зависимости от концентрации Sema3A объединяют с возрастающими концентрациями антитела как эксперименты по сдвигу IC₅₀. График Gaddum Schild выстраивают для расчета значения pA₂ (отрицательный логарифм концентрации антитела, необходимый для сдвига кривой отклика концентрации

Sema3A на коэффициент 2). Активность в М рассчитывают по значению pA_2 как =ПОТЕНЦИЯ(10; -X) и раскрывают в табл. 7 ниже.

Таблица 7

Эффективность в анализе коллапса (сдвиг IC_{50})	
Антитело по настоящему изобретению	98 пМ
YW64.3	56 пМ
YW107.4.87	Нет активности
Анти-Sema3A антитело	69 пМ

5 Пример 5. Анализ потери целостности клеток, индуцированной VEGF – эффективность антитела по настоящему изобретению в отношении индуцированного VEGF-A снижения импеданса и сравнение между антителом по настоящему изобретению, клонами YW64.3 и YW107.4.87 и ловушками VEGF.

10 VEGF-A индуцирует ослабление межклеточных контактов, что можно измерить как временное снижение импеданса в эндотелиальных клетках. Антитело по настоящему изобретению предотвращает функциональное VEGF-A-индуцированное снижение импеданса. Клеточную активность антител Nrp1 для предотвращения индуцированной VEGF потери целостности клеток оценивают

15 путем измерения снижения импеданса в эндотелиальных клетках микрососудов сетчатки человека (HRMEC) с использованием системы XCELLigence (приборы для анализа клеток в реальном времени, фирма ACEA Biosciences). Клетки HRMEC эндогенно экспрессируют нейропелин-1 (Nrp1) и VEGFR2, компоненты голорецептора VEGF. VEGF-A индуцирует ослабление клеточных соединений

20 между эндотелиальными клетками. В этом функциональном анализе добавление рекомбинантного белка VEGF-A к слою эндотелиальных клеток микрососудов сетчатки человека, достигших слияния, снижает клеточный импеданс из-за потери целостности клеток.

 Вкратце, Е-пластинки покрыты фактором прикрепления. Клетки высевают с

25 плотностью 20000 клеток на лунку, а затем оставляют расти в виде монослоя в нормальных условиях роста внутри устройства XCELLigence в течение ночи. Культуральную среду заменяют на среду без сыворотки, содержащую 0,5% БСА, на 3 часа перед добавлением VEGF-A и антител. Клеточный индекс нормализуют по моменту времени, предшествующему добавлению веществ.

Расчеты проводят при минимальном импедансе, индуцированном VEGF, примерно через 30 минут после стимуляции.

Для определения функциональной активности измеряют EC_{50} антитела для предотвращения потери целостности клеток, вызванной фиксированной концентрацией рекомбинантного VEGF-A человека. Рассчитывают среднее геометрическое значения EC_{50} для отдельных экспериментов. Результаты суммированы в табл. 8 ниже для типичного антитела по настоящему изобретению (клон I, имеющий последовательность, изображенную в SEQ ID NO: 10 как VH, и последовательность, изображенную в SEQ ID NO: 11 как VL), и несколько молекул, взятых для сравнения.

Таблица 8

Индуцированное VEGF нарушение целостности клеток IC_{50} (нМ)	
Антитело по настоящему изобретению	0,74
YW64.3	12,57
YW107.4.87	13,74
Avastin®	0,92
Lucentis®	5,94
Eylea®	0,33

Пример 6. Влияние лечения анти-VEGF и анти-Nrp1A на плотность ведущих клеток, аваскулярную область и преретинальные пучки в модели мышей с кислород-индуцированной ретинопатией (КИР)

Эффект примера антитела по настоящему изобретению (клон I, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 как VH, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 как VL) на реваскуляризацию ишемизированной аваскулярной области исследуют на модели мышей с кислород-индуцированной ретинопатией (КИР). Мышат в пометах мышей C57Bl/6J подвергают воздействию атмосферы с 75% кислородом с 7-го по 12-й день после рождения. Это приводит к регрессии кровеносных сосудов в центральной части сетчатки и формированию аваскулярной области. После возвращения к нормоксическим условиям эта область становится ишемизированной. Мышатам делают однократную интравитреальную инъекцию 10 мкг антитела в 0,5 мкл раствора в каждый глаз под анестезией изофлураном на 12-й день после рождения. На 17-й день после рождения животных умерщвляют и глаза энуклеируют. Глаза фиксируют в формалине и готовят плоские препараты сетчатки, в котором кровеносные сосуды сетчатки

окрашивают изолектином В4. Количество ведущих клеток (специализированных эндотелиальных клеток, инициирующих образование новых сосудов) подсчитывают на бессосудистом фронте вдоль всей сетчатки (граница между васкуляризированной периферической областью и бессосудистой центральной областью сетчатки). Ведущие клетки идентифицируют по присущей им особой морфологии, характеризующейся расширением филоподий. Для анализа количество ведущих клеток нормализуют по длине бессосудистого фронта. Размер аваскулярной области определяют с помощью конфокального микроскопа и программного обеспечения для анализа изображений.

10 Противоположный глаз используют для гистологического среза глазного бокала и подсчета пре-ретиальных ядер.

Антитело по настоящему изобретению увеличивает плотность ведущих клеток в модели мышей с кислород-индуцированной ретинопатией (КИР) (фиг. 3А). Кроме того, он показывает уменьшение бессосудистой области (рис. 3В).

15 Напротив, афлиберцепт-ловушка VEGF (продукт Eylea®) не увеличивает плотности верхушечных клеток и не уменьшает бессосудистой области. Существует отрицательная корреляция между плотностью ведущих клеток и размером бессосудистой области (рис. 3Б), что указывает на механистическую зависимость двух параметров. В целом, антитело по настоящему изобретению уменьшает размер ишемической бессосудистой области в животной модели ретинопатии, индуцированной кислородом, что указывает на положительный эффект при диабетической макулярной ишемии. Патологическая неоваскуляризация в стекловидном теле, о чем свидетельствуют пре-

20 ретиальные ядра, ингибируется афлиберцептом, в то время как антитело по настоящему изобретению демонстрирует умеренное снижение такого патологического состояния (фиг. 3Г).

Пример 7. Сравнение t1/2 антитела по настоящему изобретению и авастина в глазу кролика

Измеряют время полужизни типичного антитела по настоящему изобретению (клон I, имеющий последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 10 как VH, и последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 11 как VL) в различных условиях. Результаты суммированы в табл. 9 ниже.

30

Таблица 9.

	Расчет $t_{1/2}$ (сутки)	
	По настоящему изобретению	Авастин
Стекловидное тело	4,8	4,4
Сетчатка	3,5	4,8
Внутриглазная жидкость	4,5	4,5

Расчетные периоды полужизни составляют 4,8, 3,5 и 4,5 суток в стекловидном теле, сетчатке и внутриглазной жидкости, соответственно. Эти периоды полураспада аналогичны указанным в литературе для используемого в 5 медицине рекомбинантного гуманизированного моноклонального антитела IgG1 авастина (анти-VEGF, бевацизумаб, Вакгі с соавт., *Ophthalmology*, 2007), которые также были подтверждены экспериментально при работе по настоящему изобретению. Эти результаты были ожидаемыми, поскольку интравитреальный клиренс полноразмерных IgG зависит, главным образом, от их молекулярного 10 размера, что сходно для антитела по настоящему изобретению и для продукта Avastin®. Таким образом, ожидается, что фармакокинетика человека, включая время полужизни в глазу у антитела по настоящему изобретению и у продукта Avastin®, будут сходными. Сообщаемый период полувыведения продукта 15 Avastin® из глаз человека составляет $9,73 \pm 1,48$ суток (Hutton-Smith, 2016).

Пример 8. Аффинность в отношении Nrp1A человека

В настоящем изобретении оценивают аффинность связывания типового антитела по настоящему изобретению (клон I, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 как VH, и последовательность, 20 представленную в SEQ ID NO: 11 как VL).

Подвижный буфер для этого эксперимента и все разведения (кроме уставновленных) выполняют в ФСБ-Т-EDТА с 0,01% Tween20 [100 мкл 100% Tween20 добавляют к 2 л ФСБ-Т-EDТА, чтобы получить окончательную концентрацию Tween 20 0,01%]. Сенсорный чип GLM нормализуют и 25 предварительно подготавливают в соответствии с рекомендациями производителя. Сенсорный чип активируют равной смесью EDC/s-NHS в горизонтальном направлении в течение 300 сек при скорости потока 30 мкл/мин и иммобилизуют рекомбинантным белком A/G (6 мкг/мл в 10 мМ ацетате, pH 4,5) в горизонтальном направлении в течение 300 сек при скорости потока 30 30 мкл/мин, в результате чего на поверхности остается ~ 4370-4875 RU белка A/G.

Сенсорный чип дезактивируют 1М раствором этаноламина HCl в горизонтальном направлении в течение 300 сек при скорости потока 30 мкл/мин. Сенсорный чип стабилизируют в течение 18 сек раствором 0,85% фосфорной кислоты при скорости потока 100 мкл/мин 3 раза по горизонтали и 3 раза по вертикали.

Антитело по настоящему изобретению (0,6 мкг/мл) захватывают на поверхности Protein A/G вертикально в течение 300 сек при скорости потока 30 мкл/мин, что дает уровень захвата ~1678 RU. Исходный уровень стабилизируют введением ФСБ-Т-EDTA в течение 60 сек при скорости потока 100 мкл/мин горизонтально с диссоциацией 120 сек. Аналит вводят инъекцией горизонтально над захваченным антителом в течение 300 сек при скорости потока 30 мкл/мин и диссоциации в течение 1800 сек. Концентрации аналитов составляет 0 нМ, 6,25 нМ, 12,5 нМ, 25 нМ, 50 нМ и 100 нМ. Поверхность регенерируют путем введения 0,85% фосфорной кислоты в течение 18 сек при скорости потока 100 мкл/мин один раз по горизонтали и один раз по вертикали. ФСБ-Т-EDTA вводят в течение 60 сек со скоростью потока 100 мкл/мин один раз вертикально и один раз горизонтально.

Промежутки между пятнами (взаимодействия с поверхностью сенсора) и пустым анализом (ФСБ-Т-EDTA с 0,01% Tween20 или 0 нМ аналита) вычитают из необработанных данных. Затем сенсограммы в целом приспособливают к ленгмюровскому связыванию 1:1, чтобы получить значения скорости включения (k_a), скорости диссоциации (K_d) и аффинности (K_D).

Результаты суммированы в табл. 10 ниже.

Таблица 10

	Аффинность (K_d) [нМ] в отношении Nrp1 человека				
	<i>Человек</i>	<i>Макака-крабоед</i>	<i>Крыса</i>	<i>Мышь</i>	<i>Песчанка</i>
Антитело по настоящему изобретению	11,1	15,2	10,5	7,7	13,9

Пример 9. Оценка иммуногенности антитела по настоящему изобретению

В настоящем изобретении оценивают предполагаемую иммуногенность типового антитела по настоящему изобретению (клон I, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 как VH, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 как VL). Для этой цели

используют инструмент *in silico* для прогноза таких Т-клеточных эпитопов (EpiMatrix, фирма EriVax).

5 Путем скрининга последовательностей многих изолятов антител человека фирма EriVax идентифицировала несколько высококонсервативных лигандов HLA, которые предположительно обладают регуляторной активностью.

10 Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что многие из этих пептидов обладают активной толерогенностью у большинства субъектов. Эти высококонсервативные, регуляторные и разнородные Т-клеточные эпитопы известны как трегитопы (De Groot с соавт. *Blood*, 2008, 112(8):3303-3311).
15 Иммуногенный потенциал неозпитопов, содержащихся в гуманизованных антителах, можно эффективно контролировать в присутствии значительного количества трегитопов.

В целях анализа иммуногенности антител EriVax включает в себя оценку EpiMatrix Score, скорректированную с помощью Tregitope, и соответствующий
15 прогноз антитерапевтического ответа антител. Чтобы рассчитать показатель EpiMatrix с поправкой на Tregitope, баллы Tregitopes вычитаются из показателя EpiMatrix Protein Score. Установлено, что показатели, скорректированные с помощью Tregitope, хорошо коррелируют с наблюдаемым клиническим
20 иммунным ответом для набора из 23 коммерческих антител (De Groot с соавт., *Clin Immunol*, 2009, 131(2):189-201).

Результаты по шкале EpiMatrix суммированы в табл. 11 ниже.

Таблица 11

Молекула	Тяжелая цепь (% от человека)		EriVax (VH)	EriVax (Vκ)	Легкая цепь (% от человека)	
	FR	V-ген			FR	V-ген
Антитело по настоящему изобретению	90	88	10,02	-3,12	100	96

25 Последовательности антитела по настоящему изобретению имеют нижний предел шкалы EpiMatrix, что указывает на то, что антитело по настоящему изобретению обладает сильно ограниченным потенциалом иммуногенности. Указанная шкала EpiMatrix известна специалистам в данной области и с ней можно ознакомиться *inter alia* в фиг. 2 в публикации Mufarrije с соавт., *Clin Immunol.*, 2017, 176:31-41.

Пример 10. Сравнение аффинности связывания антитела по настоящему изобретению, YW64.3 и YW107.4.87 с Nrp1 человека

В настоящем изобретении оценивают аффинность связывания репрезентативного антитела по настоящему изобретению (клон I, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 как VH, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 как VL) с Nrp1 человека, а также аффинность связывания YW64.3 и YW107.4.87 с Nrp1 человека.

Подвижный буфер для этого эксперимента и все разведения (если не указано иное) выполняют в ФСБ-Т-EDTA с 0,01% Tween 20 [100 мкл 100% Tween20 добавляли к 2 л ФСБ-Т-EDTA, чтобы получить окончательную концентрацию Tween 20 0,01%]. Сенсорный чип GLM нормализуют и предварительно подготавливают в соответствии с рекомендациями производителя. Сенсорный чип активируют равной смесью EDC/s-NHS в горизонтальном направлении в течение 300 сек при скорости потока 30 мкл/мин и иммобилизуют рекомбинантным белком A/G (60 мкг/мл в 10 мМ ацетате, pH 4,5) в горизонтальном направлении в течение 300 сек при скорости потока 30 мкл/мин. Сенсорный чип дезактивируют 1М раствором этаноламина HCl в горизонтальном направлении в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин. Сенсорный чип стабилизируют в течение 18 сек раствором 0,85% фосфорной кислоты при скорости потока 100 мкл/мин 3 раза по горизонтали и 3 раза по вертикали.

Репрезентативное антитело по настоящему изобретению, а также антитела YW64.3 и YW107.4.87, захватываются на поверхности белка A/G по 3 из 6 вертикальных каналов. Nrp1A человека готовят в буфере ФСБ-Т-EDTA в концентрациях 100, 50, 25, 12,5, 6,25 и 0 нМ. Инъекцию буфера ФСБ-Т-EDTA используют в качестве двойного стандарта для анализа кинетических данных. Каждый из растворов Nrp1A человека и буфер PBS-Т-EDTA вводят одновременно по 6 горизонтальным каналам в течение 5 мин при скорости потока 40 мкл/мин с последующей 30-минутной фазой диссоциации. Поверхности регенерируют путем инъекции на протяжении 18 сек раствора 0,85% фосфорной кислоты при скорости потока 100 мкл/мин с последующей инъекцией на протяжении 60 сек ФСБ-Т-EDTA при скорости потока 100 мкл/мин. Промежутки между пятнами (взаимодействия с поверхностью сенсора) и холостой анализ (ФСБ-Т-EDTA с 0,01% Tween20 или 0 нМ аналита) вычитают

из необработанных данных. Затем сенсограммы в целом приспособливают к ленгмюровскому связыванию 1:1, чтобы получить значения скорости включения (k_a), скорости диссоциации (K_d) и аффинности (K_D).

Кинетические и аффинные данные антитела по настоящему изобретению, YW64.3 и YW107.4.87 с Nrp1 человека, соответственно, перечислены в табл. 12 ниже.

Таблица 12

Обозначение образца	Kd Nrp1 человека
анти-Nrp1A (YW64.3)	11,3 нМ
анти-Nrp1B (YW107.4.87)	37,5 нМ
Антитело по настоящему изобретению	11,1 нМ

10 Пример 11. Сравнение термостабильности белка антитела по настоящему изобретению и антитела YW64.3

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) является термодинамическим методом, который измеряет теплоемкость как функцию температуры и представляет собой наиболее точный метод оценки термостабильности конформации белка. ДСК широко используют для оценки термостабильности белков и конформационных изменений. Сигнал от ячейки с образцом сравнивают с ячейкой с контролем, в которой отсутствует белок, в идентичном растворе для обеих ячеек. По мере повышения температуры ячеек разность температур между контрольной ячейкой и ячейкой образца постоянно измеряют и калибруют по единицам мощности. Этот канал данных называется сигналом DP (differential power) или дифференциальной мощностью (ДМ) между контрольной ячейкой и ячейкой образца. Сигнал ДМ преобразуют в теплоемкость. Теплоемкость постоянно регистрируют как функцию температуры. После вычитания данных по буферу и анализа полученной термограммы можно получить энтальпию и (очевидную) среднюю точку теплового перехода (T_m) для каждого перехода.

Температура разворачивания белка (T_m) связана со стабильностью антител, в частности, с агрегацией при хранении и долговременной стабильностью терапевтического продукта. Термические переходы доменов СН2 и СН3 моноклонального антитела обычно инвариантны для разных антител в пределах изотипа, при этом домен СН2 разворачивается раньше домена СН3.

В настоящем изобретении сравнили T_m :

-антитела по настоящему изобретению, точнее «клона I», имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 как VH, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 как VL, и

5 - клон YW64.3, описанного в примере 3 настоящего изобретения, используемого для сравнения.

10 Термическое разворачивание и агрегацию ведущего соединения и YW64.3 в концентрации 1 мг/мл в 10 мМ гистидине, pH 6,0, контролируют от 25°C до 110°C при скорости сканирования 60°C/ч с помощью автоматизированной капиллярной дифференциальной сканирующей калориметрии (фирма MicroCal, LLC). Данные анализируют с программного обеспечения Origin 7.0 (фирма Origin-Lab). Все термограммы корректируют по базовой линии и подгоняют с использованием модели с двумя состояниями в Origin для получения очевидных средних температур (T_m) для разворачивания.

15 Кривые плавления ведущего соединения и YW64.3 описаны в табл. 13 ниже.

Таблица 13

	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)
Антитело по настоящему изобретению	68,33	83,23	89,70
Клон YW64.3	68,50	81,96	84,65

20 Для антитела по настоящему изобретению в 10 мМ гистидине, pH 6, первую T_m отмечают при 68,33°C, что, вероятно, соответствует разворачиванию домена CH2. Две дополнительные T_m , 83,23 °C и 89,70 °C, соответствуют домену CH3 и области Fab, соответственно. Аналогично, в случае YW64.3 домен CH2 разворачивается при 68,5°C, затем CH3 при 81,96°C и, наконец, Fab-домен при 84,65°C. Следовательно, температура разворачивания Fab примерно на 5°C выше для антитела по настоящему изобретению по сравнению с YW64.3.

25 Повышенное значение T_m означает, что меньше молекул находится в развернутом состоянии при данной температуре. Таким образом, более высокое значение T_m полезно для терапевтических белковых лекарственных препаратов, поскольку высокое значение T_m поддерживает активную конформацию при
30 физиологических температурах.

Пример 12. Антитело по настоящему изобретению не препятствует связыванию Nrp1 с VEGF

В настоящем изобретении также показывают, что репрезентативное антитело по настоящему изобретению (клон I, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 как VH, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 как VL), может связываться с Nrp1 человека даже при наличии VEGF и связывании с Nrp1 в конкурентном анализе.

Для этой цели биотинилированный фактор роста эндотелия сосудов человека-165 (hVEGF165 – Human Vascular Endothelial Growth Factor-165) захватывается наконечником стрептавидинового датчика (фирма Molecular Devices, LLC, Сан-Хосе, Калифорния) путем погружения каждого датчика в раствор биотинилированного hVEGF165 с концентрацией 10 мкг/мл, приготовленного в 1х кинетическом буфере (фирма Molecular Devices) в течение 2 мин в планшете для образцов. Затем датчики сдвигают в лунки с 1х кинетическим буфером, чтобы смыть любые несвязанные молекулы в течение 2 мин. Затем 100 нМ Nrp1 человека, приготовленного в 1х кинетическом буфере, захватывают через hVEGF165 в течение 10 мин. В итоге датчики погружают в разные концентрации антитела по настоящему изобретению (100 нМ и 400 нМ) на 10 мин.

Данные активных датчиков сравнивают с данными нескольких контролей, в том числе, тех, где нет захвата hVEGF165, отсутствует hNrp1 и отсутствует антитело.

Данные показывают, что антитело по настоящему изобретению может связываться с Nrp1 человека даже при наличии VEGF и связывании с Nrp1 (фиг. 4).

Это указывает на то, что антитело по настоящему изобретению не препятствует связыванию VEGF и Nrp1 человека.

Пример 13. Антитело по настоящему изобретению не предотвращает индуцированную VEGF-A пролиферацию эндотелиальных клеток

VEGF-A является одним из наиболее важных факторов роста эндотелиальных клеток, который индуцирует их пролиферацию. Пролиферацию эндотелиальных клеток исследуют на эндотелиальных клетках микрососудов сетчатки человека (HRMEC – human retinal microvascular endothelial cells) с использованием системы Incucyte (фирма Sartorius). В этом функциональном

анализе добавление рекомбинантного белка VEGF-A к субконфлюэнтному слою HRMEC индуцирует их пролиферацию.

Вкратце, 96-луночные планшеты покрывают желатином. Клетки высевают с плотностью 3000 клеток/лунку и затем оставляют прикрепляться в полноценной среде для роста эндотелия на 18 ч. Клетки однократно промывают базовой 5 средой для эндотелия с добавлением 2% ФСТ и затем культивируют в той же среде в течение 8 ч. Добавляли VEGF-A и/или антитела, включая репрезентативное антитело по настоящему изобретению (клон I, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 как VH, и 10 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 как VL), и клетки оставляют расти внутри устройства Incucyte. Фазово-контрастные снимки делают каждые 4 ч на протяжении всех 96 ч. Изображения используют для подсчета клеток. Количество клеток нормализуют к моменту времени перед добавлением веществ. Площадь под кривой рассчитывают по кривым роста за 15 вычетом исходных значений (фиг. 5).

В настоящем изобретении показывают, что антитело по настоящему изобретению не предотвращает пролиферацию эндотелиальных клеток, индуцированную 10 нг/мл VEGF-A, тогда как VEGF-ловушка афлиберцепт (продукт Eylea®) демонстрирует дозозависимое снижение индуцированной 20 VEGF-A пролиферации HRMEC.

Пример 14. Анализ VEGF-индуцированного образования сети –
Эффективность антитела по настоящему изобретению при VEGF-A-
индуцированном образовании эндотелиальных структур, подобных сети, в
совместной культуре с фибробластами и сравнение между антителом по
25 настоящему изобретению и VEGF-ловушкой

VEGF-A является ключевым регулятором ангиогенеза, сильно индуцируя рост новых кровеносных сосудов из ранее существовавших. Ангиогенез можно измерить *in vitro* как способность эндотелиальных клеток образовывать сеткообразные структуры при культивировании поверх слоя клеток 30 фибробластов. Образование сети можно количественно оценить после окрашивания маркером эндотелиальных клеток CD31.

В настоящем изобретении оценивают и сравнивают способность предотвращать VEGF-индуцированное образование эндотелиальной сети:

- иллюстративное антитело по настоящему изобретению (клон I, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 как VH, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 как VL), и

- анти-VEGF антитело (бевацизумаб, Avastin®).

5 Точнее, клеточную активность указанных соединений по предотвращению образования эндотелиальной сети, индуцированной VEGF, оценивают по их способности предотвращать индуцированное VEGF-A образование структур эндотелиальной сети в совместной культуре с фибробластами. HUVEC
10 эндогенно экспрессируют нейропептин-1 (Nrp1) и VEGFR2, компоненты голорецептора VEGF. В этом функциональном анализе добавление рекомбинантного белка VEGF-A к эндотелиальным клеткам, высеянными поверх слившегося слоя фибробластов, увеличивает образование сетей эндотелиальных клеток.

Вкратце, фибробласты здоровой кожи человека из ювенильной крайней
15 плоти (NHDF – normal human dermal fibroblasts) высевают в 96-луночные планшеты CellCarrier Ultra с плотностью 25000 клеток/лунку в смеси среды FGM-2 и EGM в равных частях. NHDF культивируют в нормальных условиях роста в течение 7 дней с одной сменой среды. Среду удаляют и эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC – human umbilical vein endothelial cells)
20 высевают при плотности 5000 клеток/лунку в смеси 1/10 EGM/EBM поверх NHDF.

Клеткам HUVEC дают возможность прикрепиться в инкубаторе в течение 4 ч. Среду удаляют, а затем клетки стимулируют рекомбинантным VEGF-A человека в фиксированной концентрации и в среде 1/10 EGM/EBM в
25 концентрациях кривых концентрация-ответ для антител. Клетки культивируют в течение 7 дней в нормальных условиях культивирования с заменой на свежеприготовленную стимулирующую среду на 3-й день.

Затем клетки фиксируют в 70% этаноле/H₂O на льду в течение 30 мин с последующим блокированием в течение 30 мин в DPBS + 1% БСА.
30 Эндотелиальные клетки окрашивают маркером эндотелиальных клеток CD31 антителом (Miltenyi 130-108-038) в течение 60 мин при комнатной температуре. После 3-кратной промывки DPBS добавляют 488-меченое вторичное антитело (анти-мышиный IgG PAb-A488 PLUS; Thermo A32723) и флуоресцентный краситель Hoechst и инкубируют в течение 60 мин при комнатной температуре в

темноте. Клетки промывают 3 раза DPBS. Изображения планшетов получают с помощью конфокальной системы Opera Phenix с 5-кратным «сухим» объективом в каналах для AF488 и Hoechst. Окрашивание ядер красителем Hoechst нужно только для подтверждения того, что слои клеток остаются неповрежденными после процедуры окрашивания, но не включены в анализ изображения. Область 5 сети с 488-положительным результатом рассчитывают на лунку с использованием программного обеспечения Harmony 4.9.

Для определения функциональной активности измеряют IC₅₀ антител для предотвращения образования эндотелиальной сети, индуцированного фиксированной концентрацией рекомбинантного VEGF-A человека. 10

Рассчитывают область VEGF-A-индуцированной сети (= средняя VEGF-A-индуцированная область сети за вычетом средней области базовой сети) и принимают эту величину за 100%. Результаты показаны на фиг. 6.

Представлены данные, связанные с эффектом VEGF-A, как среднее значение ± стандартное отклонение. Рассчитывают среднее геометрическое значение величин IC₅₀ для отдельных экспериментов. Максимальную эффективность рассчитывают при самых высоких концентрациях антитела как процент ингибирования VEGF-индуцированной области сети, а также рассчитывают среднее значение. Результаты суммированы в табл. 14. 15

20 Таблица 14

	Эффективность (процент подавления)	Мощность IC ₅₀ (нМ)
Антитело по настоящему изобретению	12,6	Не применимо
Продукт Avastin®	84,2	0,25

В настоящем изобретении установлено, что антитело по настоящему изобретению не оказывает существенного влияния на VEGF-A-индуцированный ангиогенез *in vitro*. Напротив, VEGF-ловушка (бевацизумаб, Avastin®) 25 эффективно и сильно предотвращает индуцированное VEGF-A образование сети.

Эти результаты подтверждают удивительное и неожиданное свойство антитела по настоящему изобретению, которое не влияет на VEGF-A-индуцированный ангиогенез, в то же время предотвращая разрушение гемато-ретинального барьера, индуцированное VEGF-A.

Пример 15. Индуцированная лазером хориоидальная неоваскуляризация у серых крыс – эффективность антитела по настоящему изобретению в отношении индуцированной лазером хориоидальной неоваскуляризации у серых крыс и сравнение антитела по настоящему по изобретению с VEGF-ловушкой

5 VEGF-A является ключевым регулятором ангиогенеза, активно индуцируя рост новых кровеносных сосудов из ранее существовавших. Ангиогенез можно измерить в глазу *in vivo* как VEGF-A-зависимую хориоидальную неоваскуляризацию после образования поражений в пигментном эпителии сетчатки (ПЭС) и мембране Бруха с помощью лазерной фотокоагуляции.

10 Неоваскуляризация может быть определена количественно после окрашивания поражений изолектином В4 в плоских препаратах ПЭС, хориоидеи и склеры. Эта экспериментальная модель *in vivo* основана на лазерном повреждении перфорированной мембраны Бруха, что приводит к рекрутированию субретинальных кровеносных сосудов из сосудистой оболочки. Это оказалось

15 полезным для тестирования антиангиогенной терапии.

В настоящем изобретении оценивают и сравнивают воздействие на индуцированную лазером хориоидальную неоваскуляризацию:

- репрезентативного антитела по настоящему изобретению (клон I, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 как VH, и
- 20 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 как VL), и
- VEGF-ловушки (афлиберцепта, Eylea®).

Самцов серых крыс (BN/Crl) с массой тела от 160 до 180 г получают от фирмы Charles River Labs (Зульцфельд, Германия). Животных под анестезией помещают перед фундус-камерой, чтобы зрительный нерв оказался в центре

25 изображения. Лечение лазером проводят зеленым аргоновым лазером (Merilas) с длиной волны 532 нм с использованием системы Micron IV (фирма Phoenix Research Laboratories, Плезантон, Калифорния, США).

Диаметр лазерного луча соответствует диаметру зрительного нерва, и лазерные импульсы с энергией 400 мВт и длительностью 150 мс используют для

30 создания 4 поражений, приходящихся на один глаз.

Повреждения располагались между крупными кровеносными сосудами на расстоянии от зрительного нерва примерно в два раза больше его диаметра. Успешный разрыв мембраны Бруха был обнаружен по образованию пузырьков

сразу после лазерного луча и подтвержден сканированием с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ).

Для интравитреальной инъекции крыс анестезируют внутривенно инъекцией кетамина (67 мг/кг) и ксилазина (6,7 мг/кг). Зрачки расширяются за
5 счет местного применения глазных капель Mydrum и, кроме того, животные получают обезболивающие глазные капли (Novesine 0,4%). Инъекцию в стекловидное тело делают шприцем Hamilton 34G в зубчатое соединение между
10 сосудистой оболочкой и цилиарным телом (*Ora serrata*). В каждый глаз вводят по две интравитреальные инъекции объемом 5 мкл. Первую интравитреальную инъекцию проводят сразу после лазерного воздействия (в рамках той же анестезии) на 1-е сутки, а вторую интравитреальную инъекцию – на 8-е сутки.

Животных умерщвляют через 14 дней после обработки лазером путем смещения шейных позвонков под анестезией. Глаза энуклеируют и вырезают по
15 зубчатой щели. Роговицу, радужную оболочку, хрусталик, стекловидное тело и сетчатку удаляют, а оставшийся глазной бокал (состоящий из пигментного эпителия сетчатки –ПЭС, сосудистой оболочки и склеры) фиксируют в параформальдегиде (ПФА PFA (4%) в течение 1 ч при 4°C, а затем переносят в ФСБ, содержащий 0,1% Triton X-100 в течение 1 ч при 4°C. Глазной бокал
20 окрашивают в течение ночи в темноте при комнатной температуре FITC- меченым изолектином В4 (10 мкг/мл в физиологическом растворе) и промывают 3 раза ФСБ. Глазной бокал переносят на предметное стекло и делают 4 надреза, чтобы получить плоскую структуру, похожую на лист клевера. Ткань покрывают средой для заливки (Vectashield H-1200, содержащей DAPI) и сверху помещают покровное стекло для получения плоского препарата ПЭС/сосудистой
25 оболочки/склеры (стороной ПЭС вверх). Образцы анализируют при длине волны 488 нм с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (фирма Carl Zeiss, Йена, Германия), и размер поражения определяют с помощью анализа изображения.

Результаты показаны на фиг. 7. Антитело по настоящему изобретению не
30 влияет на площадь поражения, в то время как ловушка VEGF Eylea® уменьшает площадь поражения на 24%. Таким образом, антитело по настоящему изобретению не влияет на VEGF-А-зависимую хориоидальную неоваскуляризацию у серых крыс.

Указанные результаты подтверждают, что антитело по изобретению не ингибирует ангиогенез, индуцированный VEGF-A. Это подтверждает, что антитело по настоящему изобретению чрезвычайно полезно в клинической ситуации, когда необходимо стимулировать реваскуляризацию, например, у
5 пациента, страдающего диабетической макулярной ишемией, которому реваскуляризация сетчатки принесет пользу.

Из описания настоящего изобретения следует, что антитело по настоящему изобретению ингибирует вазорепульсивное действие Sema3A, что позволяет перенаправлять ангиогенез на ишемические области. Кроме того, он
10 предотвращает разрушение гемато-ретиального барьера, вызванное Sema3A, с одной стороны, и VEGF-A, с другой стороны.

Несмотря на его ингибирующее действие на индуцированную VEGF-A проницаемость гемато-ретиального барьера, антитело по настоящему изобретению неожиданно не оказывает влияния на ангиогенез, индуцированный
15 VEGF-A.

Следовательно, как показано в настоящем изобретении, антитело по настоящему изобретению не предотвращает реваскуляризацию, что указывает на то, что оно не будет препятствовать ангиогенезу ишемических областей. Таким образом, эти результаты подтверждают, что антитело по настоящему
20 изобретению очень полезно для улучшения реваскуляризации ишемизированной аваскулярной области, как правило, в сетчатке пациентов с диагнозом пролиферативная диабетическая ретинопатия (ПДР), особенно ДМИ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

- 5 - переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3), и
- 10 - переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

2. Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- 15 - переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; и
- 20 - переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11;
- 25

3. Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- 30 - переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; и

- вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11;

5 где

- вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (H-CDR1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (H-CDR2), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); и

10 - вариабельная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (L-CDR1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (L-CDR2), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

15 4. Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; и

20 - вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

5. Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

25 а. вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11 соответственно;

б. вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 11
30 соответственно;

в. вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 11 соответственно;

г. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 11 соответственно;

5 д. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 11 соответственно;

е. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 11, соответственно; или

10 ж. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 11 соответственно.

15 6. Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- тяжелую цепь, включающую, предпочтительно состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25; и

20 - легкую цепь включающую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19.

7. Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

25 а. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

б. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

30 в. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

г. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

5 д. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

е. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; или

10 ж. тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

15 8. Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в аминокислотных областях 68-77 Nrp1A человека, как показано в SEQ ID NO: 26.

9. Анти-Nrp1A антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с последовательностью, как показано в SEQ ID NO: 27.

20 10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-9 для применения в качестве лекарственного средства.

25 11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из п.п. 1-9 для применения в лечении или предупреждении болезни глаз или сетчатки.

30 12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 11, где указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из ретинопатии, пролиферативной ретинопатии, такой как ретинопатия недоношенных, ишемическая ретинопатия, диабетическая ретинопатия, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетического макулярного отека, диабетической макулярной ишемии, возрастной макулярной дегенерации, пигментного

ретиinitа, наследственной дистрофии сетчатки, миопической дегенерации, окклюзии вен сетчатки, окклюзии артерии сетчатки, эндофтальмита, увеита, кистозного макулярного отека, хориоидальной неоваскулярной мембраны, вторичной по отношению к любым заболеваниям сетчатки, нейропатий зрительного нерва, глаукомы, отслойки сетчатки, токсической ретинопатии, радиационной ретинопатии, травматической ретинопатии, медикаментозной васкулопатии сетчатки, неоваскуляризации сетчатки, полипозной хориоидальной васкулопатии, васкулита сетчатки, микроаневризма сетчатки, дистрофии Фука, макулярной телеангиэктазии, синдрома Ашера и болезни Старгардта.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из п.п. 11-12, где указанное заболевание выбрано из группы, включающей диабетическую ретинопатию, в том числе пролиферативную диабетическую ретинопатию и непролиферативную диабетическую ретинопатию, ишемическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, диабетическую макулярную ишемию, возрастной макулярный отек, неоваскуляризацию сетчатки, глаукому и хориоидальную неоваскуляризацию.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из п.п. 11-13, где указанным заболеванием является диабетический макулярный отек и/или диабетическая макулярная ишемия.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения в соответствии с любым из п.п. 11-13, где

- указанное заболевание является диабетической макулярной ишемией, и
- указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент способствует регенерации сосудов в пределах ишемизированной сетчатки (реваскуляризация) и предотвращает патологическую неоваскуляризацию стекловидного тела глаза.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 15, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент не подавляет ангиогенез, индуцированный VEGF-A.

17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения для применения в соответствии с любым из п.п. 11-13, где:

- указанное заболевание представляет собой диабетический макулярный отек;

5 - указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент снижает проницаемость гемато-ретиального барьера, индуцируемую Sema3A; и

- указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент снижает проницаемость гемато-ретиального барьера, индуцируемую VEGF-A.

10 18. Фармацевтическая композиция, включающая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-17 и фармацевтически приемлемый носитель.

15 19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-17 или фармацевтическая композиция по п. 18, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят парентерально, внутривенно, интравитреально или подкожно.

20 20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-17 или фармацевтическая композиция по п. 18, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят интравитреально.

21. Выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, включающие:

25 - последовательность, кодирующую тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 or SEQ ID NO: 25, или вариabельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; и

30 - последовательность, кодирующую легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 19 или вариabельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 11.

22. Вектор экспрессии, включающий выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды по п. 21.

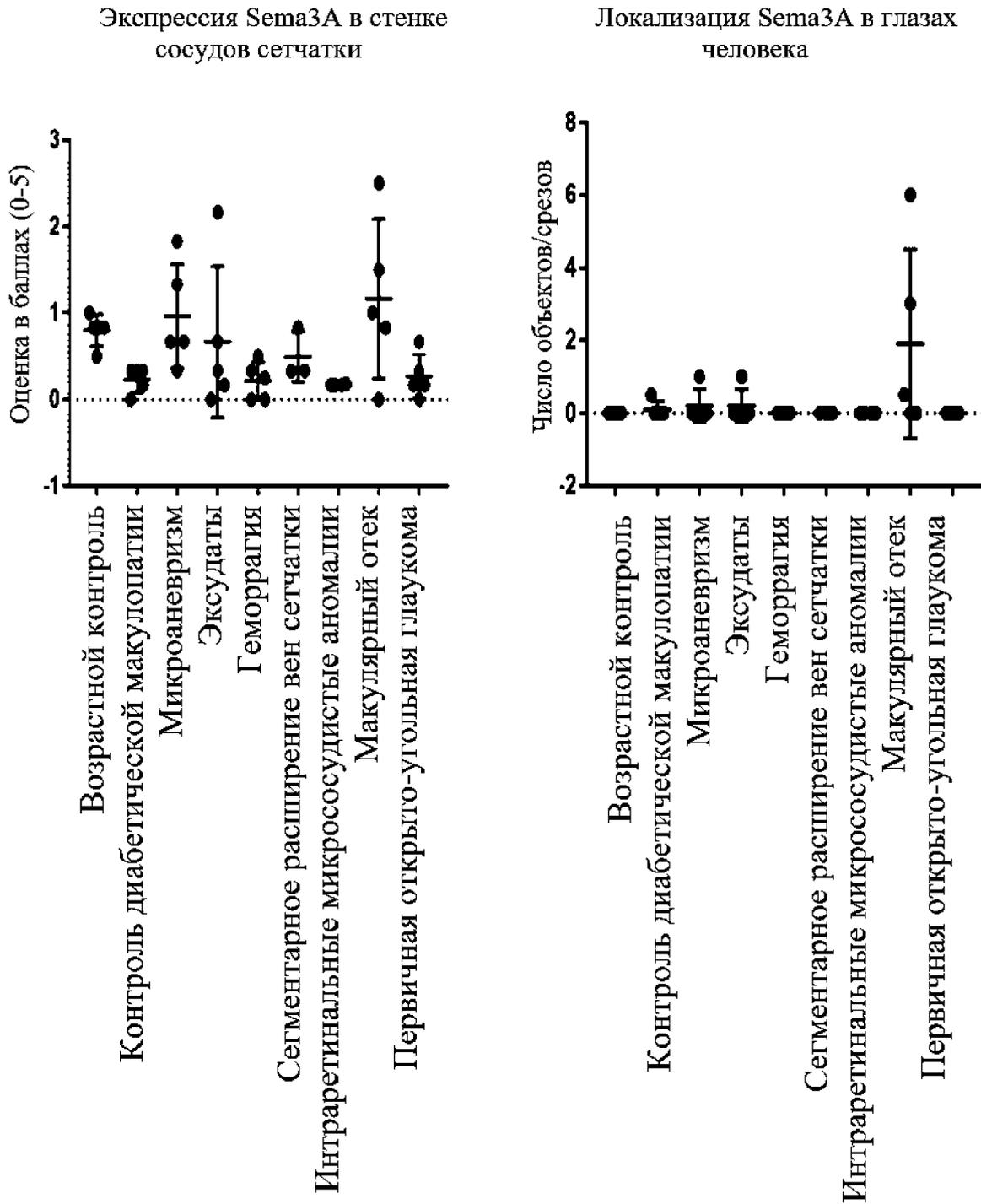
23. Клетка-хозяин, включающая выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды по п. 21 или вектор экспрессии по п. 22.

5 24. Способ получения анти-Nrp1A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий:

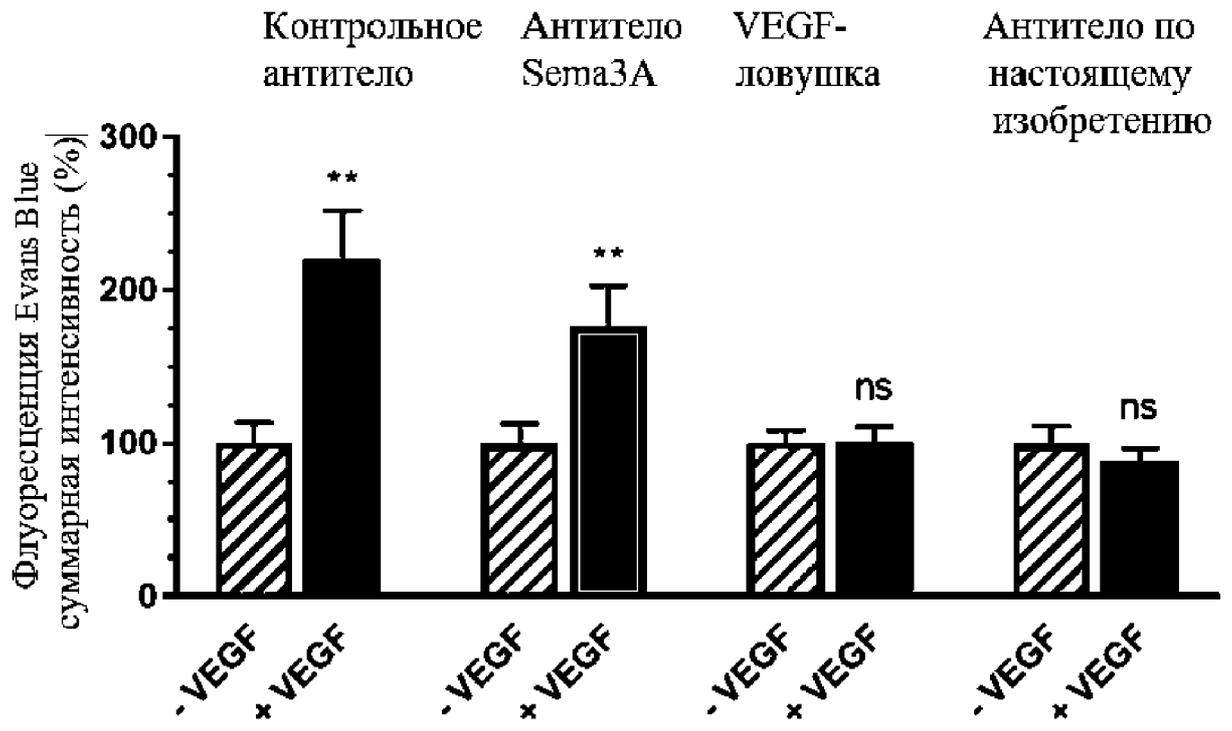
а. получение клеток-хозяев по п. 23 и

б. культивирование клеток-хозяев.

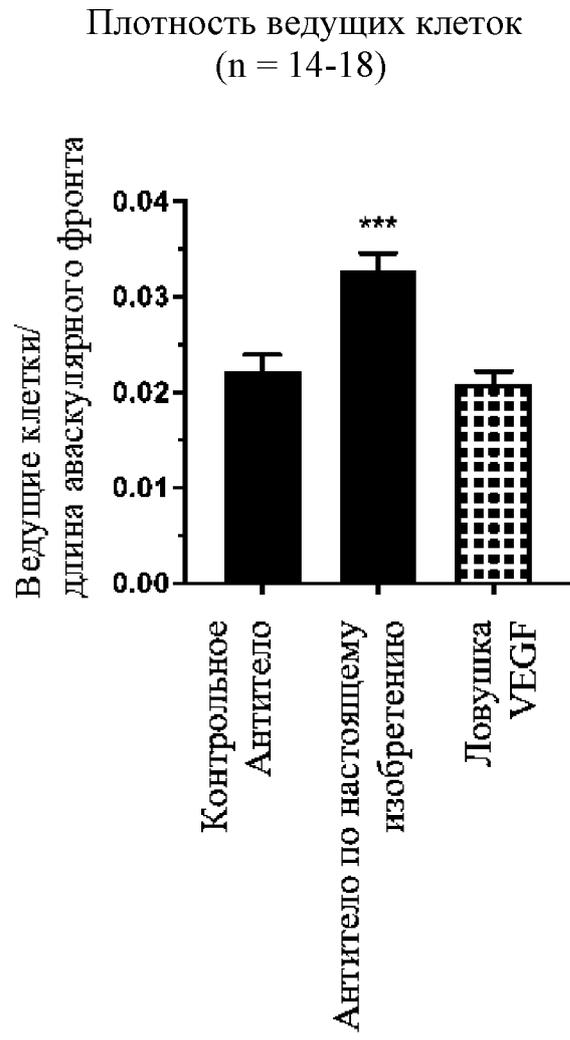
10 25. Способ по п. 24, дополнительно включающий выделение и очистку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.



Фигура 1



Фигура 2

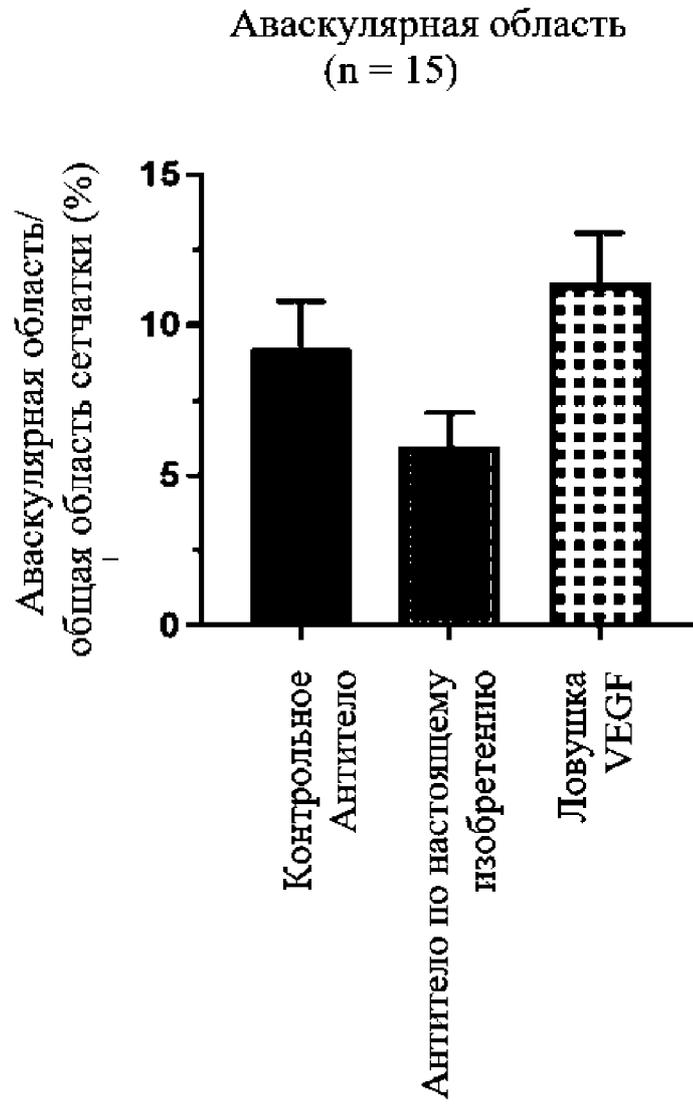


Фигура 3А

Плотность ведущих клеток относительно аваскулярной области

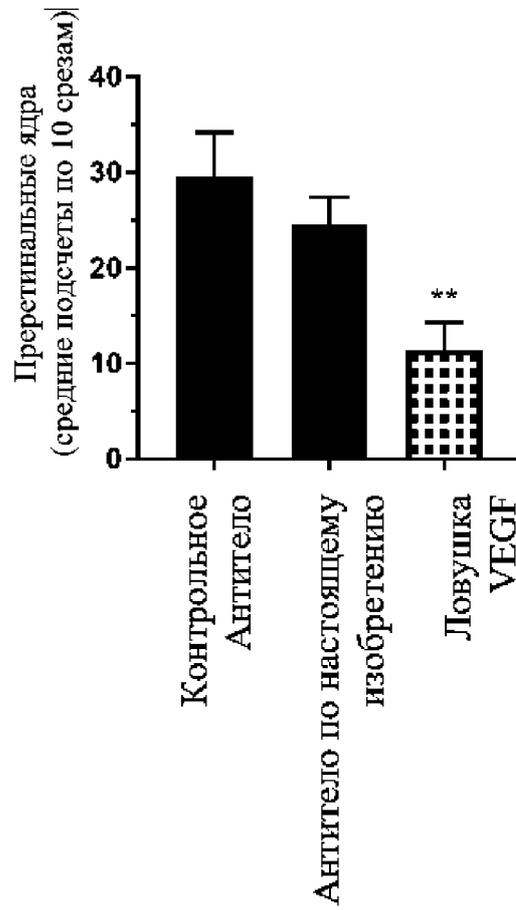


Фигура 3Б

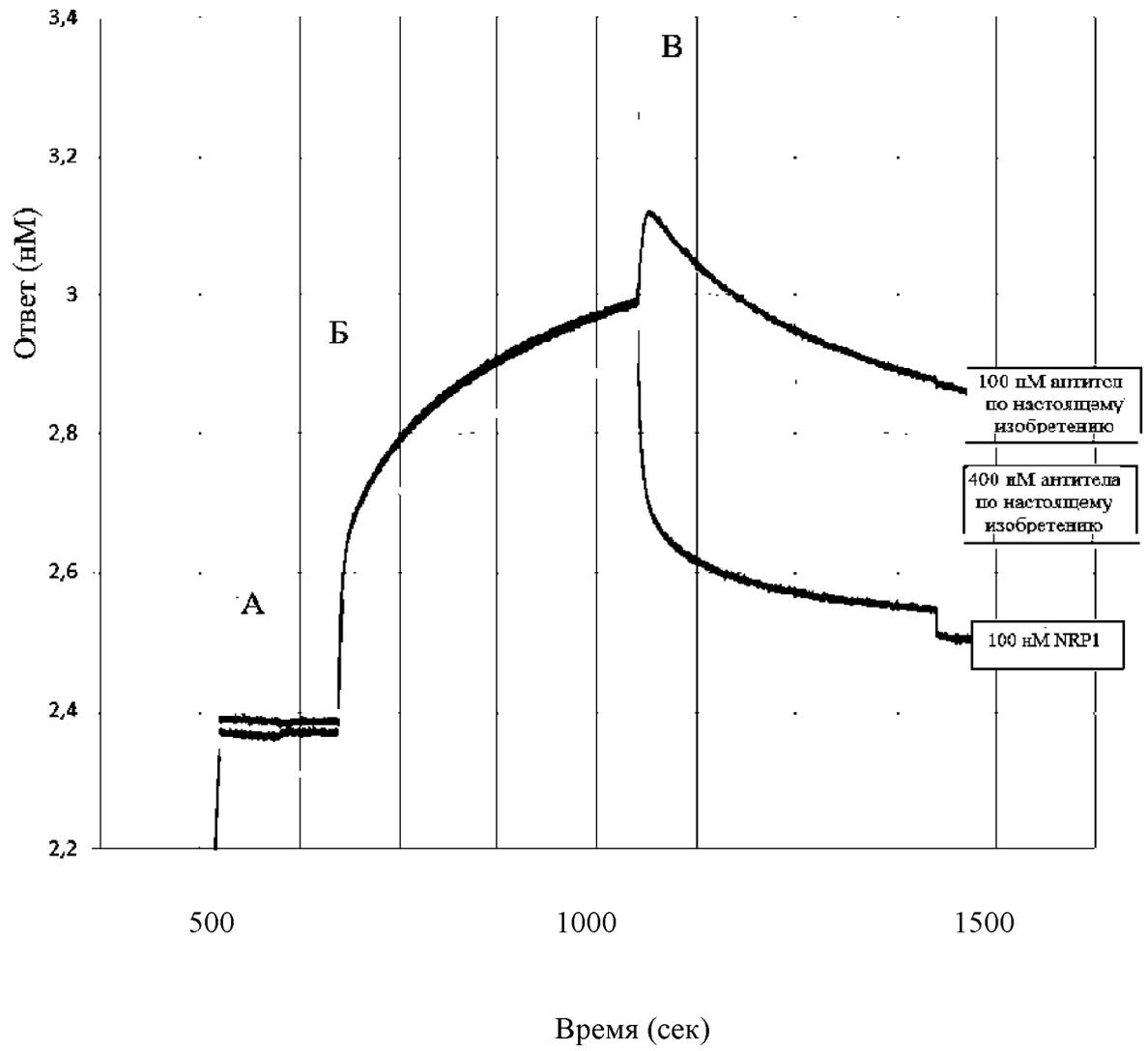


Фигура 3В

Пучки преретинальной неоваскуляризации

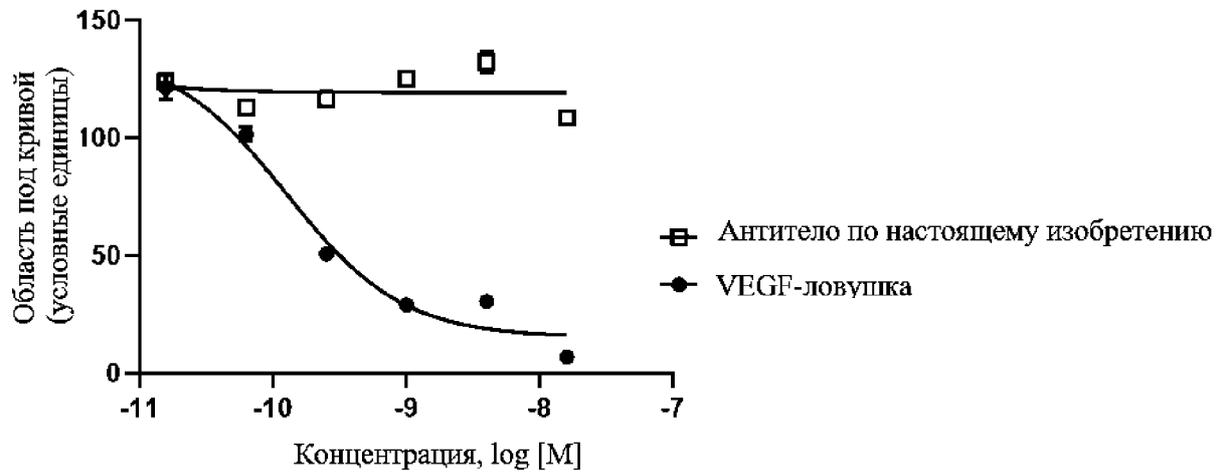


Фигура 3Г



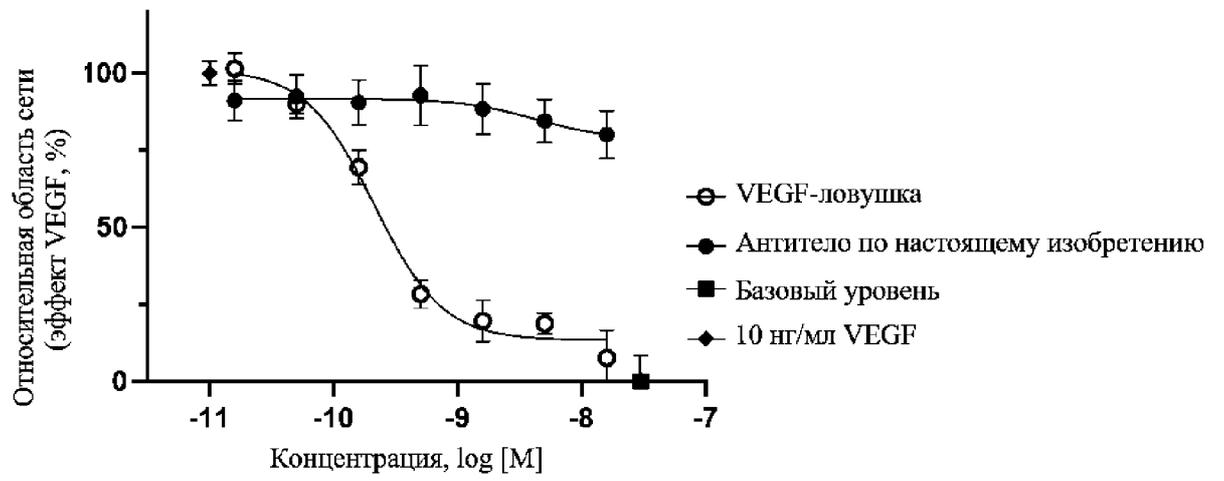
Фигура 4

VEGF-A-индуцированная пролиферация эндотелиальных клеток
микрососудов сетчатки человека (HRMEC)



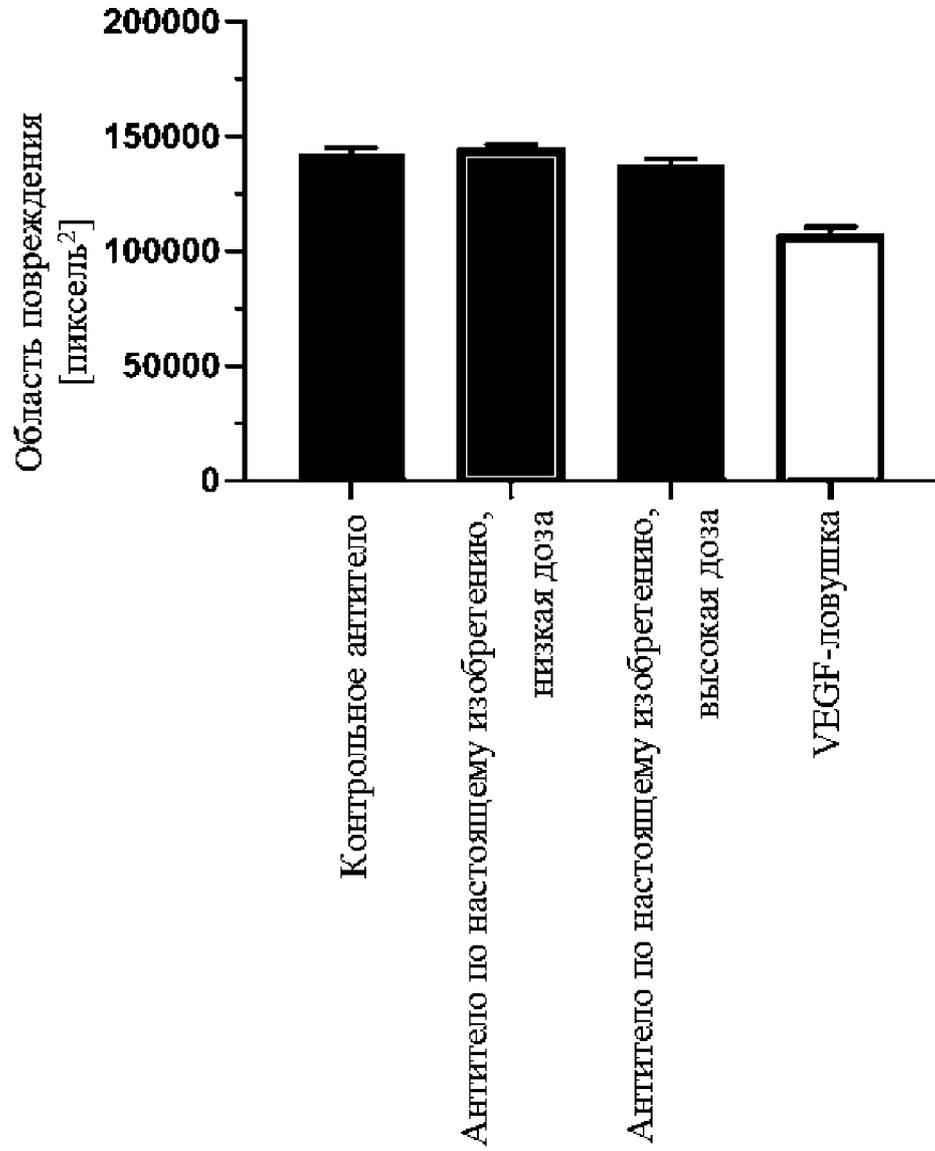
Фигура 5

VEGF-A-индуцированное формирование эндотелиальной сети



Фигура 6

Зона хориоидальных неоваскулярных поражений у крыс Brown Norway после глазной лазерной фотокоагуляции



Фигура 7