

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390317** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.03.22

(51) Int. Cl. *A61P 27/02* (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.14

(54) **АНТИТЕЛА К БЕТАЦЕЛЛЮЛИНУ, ИХ ФРАГМЕНТЫ И МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ**

(31) 63/052,789; 63/156,709

(32) 2020.07.16; 2021.03.04

(33) US

(86) PCT/IB2021/056363

(87) WO 2022/013787 2022.01.20

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Бигелоу Чад Эрик, Каррион Ана
Мария, Честейн Джеймс Эдгар, Кларк
Кирк Ли, Этемад-Гилбертсон Биян
Александр, Гхош Джой Гиспати,
Хэнкс Шон Майкл (US), Хаубст
Николь (DE), Айер Ганеш Раджан
(US), Мокер Нина (DE), Нгуен Эндрю
Анх, Пур Стефен Хендрик, Цю
Юбин, Рангасвами Налини Веламур,
Стефанидакис Майкл (US), Токсоз
Энгин (DE), Тварог Майкл Збигнев
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрены антитела к ВТС, способы получения указанных антител, фармацевтические композиции, содержащие указанные антитела, и способы применения указанных антител. В настоящем изобретении также предусмотрены мультиспецифические связывающие молекулы, например биспецифические антитела, содержащие функциональную единицу, связывающую ВТС, и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF.

A1

202390317

202390317

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576978EA/032

АНТИТЕЛА К БЕТАЦЕЛЛЮЛИНУ, ИХ ФРАГМЕНТЫ И МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ И ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/052789, поданной 16 июля 2020 года, и предварительной заявки на патент США № 63/156709, поданной 4 марта 2021 года, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте. Перечень последовательностей, содержащийся в файле под названием "PAT058888-WO-РСТ SQL_ST25", который составляет 204786 байт (измерено в операционной системе MS-Windows) и был создан 25 июня 2021 года, подан с данным документом и включен в данный документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

[2] Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, способам их получения, фармацевтическим композициям, содержащим их, и способам их применения.

Уровень техники

[3] Бетацеллюлин (BTC), представитель семейства эпидермального фактора роста (EGF), изначально был выделен из кондиционированной среды линии В-клеток опухоли поджелудочной железы мыши (Shing et al., Science, 259, 1604-1607, 1993). BTC является лигандом для семейства рецепторных тирозинкиназ EгbВ и главным образом активирует гомодимеры EгbВ1 и EгbВ4, запуская антиапоптотический и предпролиферативный сигнальные пути, такие как пути Ras/MAPK и PL3K/АКТ.

[4] BTC изначально экспрессируется в виде однопролетного трансмембранного белка и последовательно расщепляется (активируется) представителями семейства ММР до секретируемого белка с молекулярной массой 9 кДа. Расщепление заякоренных в мембране форм BTC с высвобождением секретируемой формы происходит преимущественно с помощью ADAM-10 (дезинтегрин и металлопротеаза-10) (Sahin et al., J. Cell Biol. 164, 769-779, 2004; Sahin and Blobel, FEBS Lett 581, 41-44, 2007; и Sanderson et al., J. Biol. Chem. 280, 1826-1837, 2005). Зрелый, секретируемый BTC человека представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 32 кДа, состоящий из 80 аминокислотных остатков (Asp1-Тур80, остатки 32-111 из 178 остатков, заякоренный в мембране белок-предшественник (pro-BTC), описанный как NP_001720.1 или SEQ ID NO: 156), образованный расщеплением pro-BTC. Карбоксильный конец области из 50 остатков BTC (Arg31-Тур80) содержит консервативную консенсусную последовательность белков семейства EGF.

[5] Сильная экспрессия мРНК BTC была обнаружена в ряде тканей, включая поджелудочную железу, печень, почку и тонкую кишку, в дополнение к несколько более

низкой экспрессии в сердце, легком, печени, скелетной мышце, почке, предстательной железе, яичке, яичнике и толстой кишке (Sasada et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 1173-1179, 1993; Sasada and Igarashi, *Nihon. Rinsho.* 51, 3308-3317, 1993; и Seno et al., *Growth Factors* 13, 181-191, 1996). Мыши с нокаутом по ВТС являются жизнеспособными и фертильными, не проявляя явного фенотипа.

[6] Высокая экспрессия мРНК ВТС позволяет предположить, что ВТС может обладать физиологической ролью в развитии и функционировании поджелудочной железы. Было обнаружено, что уровень ВТС повышен в 7,5 раз в 9 из 10 случаев рака поджелудочной железы по сравнению с нормальными уровнями экспрессии в поджелудочной железе (Yokoyama et al., 1995). В поджелудочной железе экспрессия ВТС была локализована в популяциях островковых клеток, тесно связанных с В-клетками, продуцирующими инсулин (Miyagawa et al., *Endocr. J.* 46, 755-764, 1999). ВТС может регулировать физиологию панкреатических островков и может индуцировать пролиферацию клеток поджелудочной железы плода и стимулировать превращение клеток, отличных от β -клеток в β -подобные клетки, продуцирующие инсулин. Более того, о сверхэкспрессии ВТС сообщалось при аденокарциномах эндометрия (Srinivasan et al., 1999); гепатоцеллюлярных карциномах (Moon et al., 2006); плоскоклеточных карциномах головы и шеи (O-charoenrat et al., 2000); и карциномах желудка (Jemal et al., 2011).

[7] В глазах млекопитающих белок ВТС синтезируется пигментным эпителием сетчатки (RPE), эндотелиальными клетками и клетками Мюллера (Anand-Apte et al., *PLoS One* 5, e13444, 2010) и локализуется во наружном гематоретинальном барьере.

[8] Хотя общую роль ВТС в функциях эндотелия сосудов изучали, его конкретная роль в сетчатке в настоящее время неясна. Первоначальные сообщения о пролиферативном эффекте ВТС на клетки RPE (Shing et al., 1993) и его проангиогенных функциях позволили предположить, что он может играть роль в развитии пролиферативной диабетической ретинопатии (PDR). Хотя у мышей с диабетом не наблюдается PDR, они демонстрируют повышенную проницаемость сосудов сетчатки (Poulaki et al., *J. Clin. Invest.* 109, 805-815, 2002). Кроме того, было установлено, что в мышинной модели диабета растворимый расщепленный ВТС повышен в сетчатке и способствует повышению проницаемости сосудов сетчатки (Anand-Apte et al., 2010).

[9] Субретинальная инъекция аденоассоциированного вируса, экспрессирующего растворимый ВТС, приводит к резкому повышению проницаемости сосудов сетчатки у мышей. В целом, ВТС представляется действенным фактором проницаемости, который может играть критическую роль в развитии повышенной проницаемости сосудов сетчатки при диабетической ретинопатии и быть потенциальной терапевтической мишенью при данном заболевании.

[10] Было показано, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является ключевым медиатором неоваскуляризации, связанной с опухолями и внутриглазными нарушениями. VEGF представляет собой действенный фактор проницаемости сосудов и играет основную роль в возникновении утечки жидкости через сосуды. В глазах

млекопитающих VEGF локализуется во внутреннем гематоретинальном барьере. Уровни VEGF в значительной степени повышены в стекловидном теле пациентов с диабетическим макулярным отеком (DME) по сравнению с недиабетическими состояниями глаз (Funatsu et al., *Ophthalmology* 2009 116:73-9).

[11] Множество лекарственных средств на основе антител к VEGF применяют для лечения офтальмологических нарушений, таких как возрастная макулярная дегенерация (AMD) и/или DME, включая пэгаптаниб (аптамер против VEGF; Macugen, OSI); ранибизумаб (Fab к VEGF; Lucentis, Genentech); бевацизумаб (полноразмерное гуманизированное антитело; Avastin, Genentech); бролуцизумаб (scFv к VEGF; Beovu, Novartis) и афлиберцепт (Fab к VEGF; Eylea, Regeneron). Другие молекулы на основе антител к VEGF включают растворимые аналоги рецептора VEGF, "ловушку" для VEGF (Regeneron), бевасирианиб на основе малых интерферирующих РНК (siРНК) (Opko Health) и рапамицин (Sirolimus, MacuSight). Лекарственные средства на основе антител к VEGF доставляются в глаз в виде инъекции в стекловидное тело под местной анестезией.

[12] Однако существует неудовлетворенная потребность, поскольку средства терапии на основе антител к VEGF сами по себе дают субоптимальный ответ у пациентов с офтальмологическими нарушениями, такими как DME. Хотя реагенты на основе антител к VEGF уменьшают макулярный отек, ингибируют ангиогенез и улучшают зрение, не у всех пациентов с DME наблюдаются существенные продолжительные улучшения. Например, примерно у 25% пациентов, которые получают средства терапии на основе антител к VEGF, не показано улучшение остроты зрения после 12 месяцев лечения, и почти 50% пациентов не достигают зрения 20/40, необходимого для официально разрешенного вождения (Mitchell et al., 2011). Альтернативные виды терапии, такие как лазерная фотокоагуляция или интравитреальное введение стероидов, менее эффективны и имеют побочные эффекты (такие как катаракта при внутриглазном введении стероидов (Curr. Ophthalmol. Rep. 2013 Sep 1(3))).

[13] Следовательно, существует необходимость в идентификации факторов, которые могут дополнительно усилить ответ на средства терапии на основе антител к VEGF, для улучшения терапии для пациентов с субоптимальным ответом на терапию против VEGF.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[14] На фиг. 1 показана структура связывания Fab с ВТС. ВТС показан в виде поверхности со сплошной заливкой и Fab показан в виде ленты. Для иллюстрации разницы в способах связывания с Fab структура ВТС находится в одинаковой ориентации на всех панелях: А) комплекс ВТС/Fab NVS2, В) комплекс ВТС/Fab NVS3, С) комплекс ВТС/Fab NVS1 и D) комплекс ВТС/Fab NVS4.

[15] На фиг. 2 показаны структурные остатки эпитопа Fab, связывающегося с ВТС. ВТС показан в виде ленты с варьирующимися ориентациями, чтобы выделить остатки эпитопа, перечисленные в таблицах 12, 13, 14 и 15. Остатки эпитопа показаны в шаростержневом виде и помечены. А) комплекс ВТС/Fab NVS2, В) комплекс ВТС/Fab

NVS3, С) комплекс BTC/Fab NVS1 и D) комплекс BTC/Fab NVS4.

[16] На фиг. 3 представлено графическое изображение моноспецифических и биспецифических антител.

[17] На фиг. 4 показаны изображения сетчатки мышей, которым инъецировали scAAV2-CMV-BTC, полученные с помощью съемки глазного дна (левая панель) и визуализации FFA (правая панель).

[18] На фиг. 5 показаны изображения сетчатки мышей, которым инъецировали scAAV2-CMV-BTC, полученные с помощью сканирующей лазерной офтальмоскопии.

[19] На фиг. 6A-6G показано связывание моноспецифических и биспецифических антител с BTC и/или VEGF.

[20] На фиг. 7A-7D показано связывание BTC с ErbB1 в присутствии моно- (NVS1-4) и биспецифических (NVS11-14) антител.

[21] На фиг. 8A-8D показано связывание BTC с ErbB4 в присутствии моно- (NVS1-4) и биспецифических (NVS11-14) антител; на фиг. 8E и 8F показано связывание BTC с ErbB1 или ErbB4 в присутствии NVS1, NVS11 или NVS8; на фиг. 8G показано фосфорилирование EGFR, индуцированное BTC, в присутствии NVS1, NVS11 или NVS8.

[22] На фиг. 9A-9C показано связывание VEGF-A с VEGFR2 в присутствии моно- (NVS8) и биспецифических (NVS11, NVS12 и NVS14) антител.

[23] На фиг. 10A-10D показано индуцированное BTC фосфорилирование ERK1/2 в присутствии моно- (NVS1-4) и биспецифических (NVS11-14) антител.

[24] На фиг. 11A-11D показано индуцированное BTC фосфорилирование ErbB3 в присутствии моно- (NVS1-4) и биспецифических (NVS11-14) антител.

[25] На фиг. 12A-12D показано индуцированное BTC фосфорилирование HER3 в присутствии моно- (NVS1-2) и биспецифических (NVS11-14) антител.

[26] На фиг. 13A и 13B показана индуцированная BTC проницаемость клеток пигментного эпителия сетчатки (RPE) и клеток эндотелия микрососудов сетчатки человека (HREC) *in vitro* в присутствии моно- (NVS1 или NVS8) и биспецифических (NVS11) антител.

[27] На фиг. 14 показана индуцированная гипергликемией утечка жидкости из сетчатки у крыс с диабетом в присутствии антител к BTC (LZR230) и/или VEGF (4G3).

[28] На фиг. 15A показана оптическая когерентная томография (ОСТ) и гистологические изображения глаз кролика после обработки VEGF или BTC; на фиг. 15B представлены иллюстративные изображения ОСТ, демонстрирующие эффект интравитреального введения бетацеллюлина в сетчатку кролика после интравитреальной инъекции NVS1 или NVS11.

[29] На фиг. 16 показано изменение толщины сетчатки глаз кролика после обработки с помощью NVS1 или NVS11.

[30] На фиг. 17 показано изменение толщины сетчатки глаз кролика после обработки с помощью NVS2 или NVS12.

[31] На фиг. 18A показано изменение толщины сетчатки глаз кролика после

обработки с помощью NVS1, NVS11, NVS2 или NVS12; на фиг. 18B показаны индуцированные BTC морфологические изменения RPE в присутствии NVS11 или NVS1; на фиг. 18C показана утечка жидкости через сосуды сетчатки у кроликов (иллюстративные изображения) в присутствии NVS11 или NVS8; на фиг. 18D показана индуцированная VEGF утечка жидкости через сосуды сетчатки у кроликов (количественное определение с помощью флуоресцентной ангиографии) в присутствии NVS11 или NVS8.

[32] На фиг. 19 показаны изображения флуоресцентной ангиографии глаз кролика после доставки VEGF или BTC с помощью IVT.

[33] На фиг. 20 показаны значения утечки флуоресцеина через сосуды из глаз отдельных кроликов после обработки с помощью NVS8, NVS11 или NVS12.

[34] На фиг. 21 показаны значения утечки флуоресцеина через сосуды из глаз отдельных кроликов после обработки с помощью NVS11, NVS12 или NVS8.

[35] На фиг. 22 показано изменение значений общей толщины сетчатки для отдельных глаз кроликов после обработки с помощью ранибизумаба или NVS1.

[36] На фиг. 23 показано изменение толщины сетчатки у кроликов после обработки с помощью NVS1 или PNVS1.

Сущность изобретения

[37] Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с бетацеллюлином (BTC).

[38] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание BTC с ErbB1, ErbB4 или обоими.

[39] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует индуцированную BTC активацию фосфо-ERK1/2.

[40] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует индуцированную BTC активацию фосфо-HER3.

[41] В настоящем изобретении также предусмотрены выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент характеризуются константой диссоциации (KD), составляющей 5 пМ или меньше.

[42] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с BTC, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

[43] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одним остатком из SEQ ID NO: 157, выбранным из группы, состоящей из G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, R51, R53, F54, V56, A57, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76.

[44] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, Q59, T60, P61 и R73 из SEQ ID NO: 157.

[45] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые

специфически связываются с ВТС, содержат определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (HCDR1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (HCDR2), и определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (HCDR3), представленные под SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно, и определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (LCDR1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (LCDR2) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (LCDR3), представленные под SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно.

[46] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 4, 2 и 3 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно.

[47] В одном аспекте HCDR1 содержит консенсусную последовательность XYAIS, и/или HCDR2 содержит консенсусную последовательность GIXPXXGXXXYAQKFQG, и где X представляет собой любую аминокислоту и может не совпадать в разных положениях.

[48] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 168 и последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 169 или последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 170 и последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 171.

[49] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 5, 6 и 3 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно.

[50] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 20, 18 и 16 соответственно.

[51] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой цепи (VL), содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно.

[52] В одном аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[53] В одном аспекте различия в аминокислотной последовательности представляют собой консервативные замены.

[54] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые

специфически связываются с ВТС, содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно.

[55] В одном аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 11 и 22 соответственно.

[56] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 12 и 23 соответственно.

[57] В одном аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 13 и 24 соответственно.

[58] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат 1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в VH с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10, и 2) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 21.

[59] В одном аспекте HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO: 1, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно; SEQ ID NO: 4, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно; SEQ ID NO: 5, 6, 3, 17, 18 и 19 соответственно или SEQ ID NO: 7, 8, 9, 20, 18 и 16 соответственно.

[60] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 4, 5 и 7, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 6 и 8, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 9, и

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 17 и 20, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 18, LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 19.

[61] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно.

[62] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 12 и 23 соответственно.

[63] В настоящем изобретении также предусмотрено выделенное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, которые содержат VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно.

[64] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76 из SEQ ID NO: 157.

[65] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 38, 39 и 40 соответственно.

[66] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 28, 26 и 27 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 38, 39 и 40 соответственно.

[67] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 29, 30 и 27 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 41, 42 и 43 соответственно.

[68] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 44, 42 и 40 соответственно.

[69] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно.

[70] В одном аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[71] В одном аспекте различия в аминокислотной последовательности представляют собой консервативные замены.

[72] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно.

[73] В одном аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 35 и 46 соответственно.

[74] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 36 и 47 соответственно.

[75] В одном аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью

нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 37 и 48 соответственно.

[76] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат 1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в VH с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34, и 2) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 45.

[77] В одном аспекте HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO: 25, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно; SEQ ID NO: 28, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно; SEQ ID NO: 29, 30, 27, 41, 42 и 43 соответственно или SEQ ID NO: 31, 32, 33, 44, 42 и 40 соответственно.

[78] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 28, 29 и 31, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 30 и 32, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 и 33, и

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38, 41 и 44, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 и 42, LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40 и 43.

[79] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно.

[80] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 36 и 47 соответственно.

[81] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, которые содержат VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно.

[82] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, R51, R53, F54 и V56 из SEQ ID NO: 157.

[83] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 25, 49 и 50 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 58, 59 и 60 соответственно.

[84] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 28, 49 и 50 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 58, 59 и 60 соответственно.

[85] В одном аспекте HCDR1 содержит консенсусную последовательность XXAMX, и/или HCDR2 содержит консенсусную последовательность XXXX/-XXXXTXYXDSVKГ, где X представляет собой любую аминокислоту и может отличаться в разных положениях, и где X/- представляет собой любую аминокислоту или делецию.

[86] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 190 и последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 191.

[87] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 29, 51 и 50 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 61, 62 и 63 соответственно.

[88] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 31, 52 и 53 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 64, 62 и 60 соответственно.

[89] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно.

[90] В одном аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[91] В одном аспекте различия в аминокислотной последовательности представляют собой консервативные замены.

[92] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно.

[93] В одном аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 55 и 66 соответственно.

[94] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 56 и 67 соответственно.

[95] В одном аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 57 и 68 соответственно.

[96] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые

специфически связываются с ВТС, содержат 1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в VH с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 54, и 2) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 65.

[97] В одном аспекте HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO: 25, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно; SEQ ID NO: 28, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно; SEQ ID NO: 29, 51, 50, 61, 62 и 63 соответственно или SEQ ID NO: 31, 52, 53, 64, 62 и 60 соответственно.

[98] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 28, 29 и 31, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49, 51 и 52, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50 и 53, и

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58, 61 и 64, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59 и 62, LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60 и 63.

[99] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно.

[100] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 56 и 67 соответственно.

[101] В настоящем изобретении также предусмотрены выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, которые содержат VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно.

[102] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, A57, Q59, T60, P61, A72, R73 и E75 из SEQ ID NO: 157.

[103] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно.

[104] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные

под SEQ ID NO: 72, 70 и 71 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно.

[105] В одном аспекте HCDR2 содержит консенсусную последовательность XIXXXXXXXXXYADSVKG, и/или LCDR3 содержит консенсусную последовательность QQYDXXXT, и где X представляет собой любую аминокислоту и может не совпадать в разных положениях.

[106] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат последовательность тяжелой цепи и легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 194 и 195 соответственно; SEQ ID NO: 196 и 197 соответственно; SEQ ID NO: 198 и 199 соответственно; SEQ ID NO: 200 и 201 соответственно; SEQ ID NO: 202 и 203 соответственно; SEQ ID NO: 204 и 205 соответственно и SEQ ID NO: 206 и 207 соответственно.

[107] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 73, 74 и 71 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 85, 18 и 86 соответственно.

[108] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 75, 76 и 77 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 87, 18 и 84 соответственно.

[109] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

[110] В одном аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[111] В одном аспекте различия в аминокислотной последовательности представляют собой консервативные замены.

[112] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

[113] В одном аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 79 и 89 соответственно.

[114] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 80 и 90 соответственно.

[115] В одном аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 81 и 91 соответственно.

[116] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат 1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в VH с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 78, и 2) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 88.

[117] В одном аспекте HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат SEQ ID NO: 69, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно; SEQ ID NO: 72, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно; SEQ ID NO: 73, 74, 71, 85, 18 и 86 соответственно или SEQ ID NO: 75, 76, 77, 87, 18 и 84 соответственно.

[118] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 69, 72, 73 и 75, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70, 74 и 76, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71 и 77, и

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82, 85 и 87, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83 и 18, LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84 и 86.

[119] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

[120] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 80 и 90 соответственно.

[121] В настоящем изобретении также предусмотрены выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, которые содержат VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

[122] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, находятся в формате, выбранном из группы, состоящей из выделенного антитела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и scFv.

[123] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, представляют собой Fab.

[124] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, представляют собой scFv.

[125] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые

специфически связываются с ВТС, представляют собой выделенное антитело.

[126] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, представляют собой моноклональное человеческое антитело.

[127] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, представляют собой моноклональное гуманизированное антитело.

[128] В одном аспекте Fab содержит Fc-область.

[129] В одном аспекте Fc-область выбрана из группы, состоящей из Fc-области из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE и IgD.

[130] В одном аспекте Fc-область содержит последовательность константной области каппа-цепи иммуноглобулина человека, представленную под SEQ ID NO: 159.

[131] В одном аспекте Fc-область содержит первый константный домен Ig тяжелой цепи (домен CH1) иммуноглобулина человека, представленный под SEQ ID NO: 160.

[132] В настоящем изобретении предусмотрены выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны конкурировать с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, как описано на всем протяжении данного документа, за связывание с ВТС и уменьшение передачи сигнала, опосредованной ВТС.

[133] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, содержат тяжелую цепь и легкую цепь, представленную под SEQ ID NO: 168 и 169 соответственно; SEQ ID NO: 170 и 171 соответственно; SEQ ID NO: 172 и 173 соответственно; SEQ ID NO: 174 и 175 соответственно; SEQ ID NO: 176 и 177 соответственно; SEQ ID NO: 178 и 179 соответственно; SEQ ID NO: 180 и 181 соответственно; SEQ ID NO: 182 и 183 соответственно; SEQ ID NO: 184 и 185 соответственно; SEQ ID NO: 186 и 187 соответственно или SEQ ID NO: 188 и 189 соответственно.

[134] В настоящем изобретении предусмотрен полинуклеотид, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано на всем протяжении данного документа.

[135] В одном аспекте кассета экспрессии содержит полинуклеотид, как описано на всем протяжении данного документа.

[136] В одном аспекте вектор содержит кассету экспрессии, как описано на всем протяжении данного документа.

[137] В одном аспекте клетка-хозяин содержит полинуклеотид или вектор, как описано на всем протяжении данного документа.

[138] В настоящем изобретении также предусмотрен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина в подходящих условиях для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[139] В одном аспекте способ дополнительно включает проведение очистки

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[140] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано на всем протяжении данного документа.

[141] В одном аспекте фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.

[142] В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции, как описано на всем протяжении данного документа.

[143] В одном аспекте у субъекта имеется заболевание, выбранное из группы, состоящей из карциномы поджелудочной железы, рака молочной железы, аденокарциномы эндометрия, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и карциномы желудка.

[144] В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят путем, выбранным из группы, состоящей из внутривенного введения, внутримышечного введения, подкожного введения, парентерального введения, спинального введения и эпидермального введения.

[145] В одном аспекте у субъекта имеется офтальмологическое нарушение.

[146] В одном аспекте офтальмологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной глаукомы, диабетической ретинопатии, макулярного отека, патологической миопии, окклюзий вен сетчатки, ретинопатии недоношенных, аномальной пролиферации сосудов, ассоциированной с факатозами, центральной серозной хориоретинопатии и острой мультифокальной плакоидной пигментной эпителиопатии.

[147] В одном аспекте офтальмологическое нарушение представляет собой диабетический макулярный отек.

[148] В одном аспекте введение осуществляется путем субретинальной инъекции.

[149] В одном аспекте введение осуществляется путем интравитреальной инъекции.

[150] В одном аспекте фармацевтическая композиция дополнительно содержит антагонист на основе антитела к VEGF.

[151] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой ранибизумаб.

[152] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой бевацизумаб.

[153] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой афлиберцепт.

[154] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой

бролуцизумаб.

[155] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой пэгаптаниб.

[156] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF содержит тяжелую цепь и легкую цепь, представленные под SEQ ID NO: 103 и 114 соответственно.

[157] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 104 и 115.

[158] В одном аспекте способ дополнительно включает введение субъекту антагонист на основе антитела к VEGF.

[159] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой ранибизумаб.

[160] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой бевацизумаб.

[161] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой афлиберцепт.

[162] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой бролуцизумаб.

[163] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой пэгаптаниб.

[164] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF содержит тяжелую цепь и легкую цепь, представленные под SEQ ID NO: 103 и 114.

[165] В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 104 и 115.

[166] В настоящем изобретении предусмотрен набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию, как описано на всем протяжении данного документа.

[167] В одном аспекте набор дополнительно содержит инструкцию по применению.

[168] В одном аспекте набор дополнительно содержит шприц.

[169] В настоящем изобретении предусмотрена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая 1) связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и 2) связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF.

[170] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС связывается с содержащей ВТС аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 157.

[171] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС связывается с по меньшей мере одним остатком из SEQ ID NO: 157, выбранным из группы, состоящей из G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, R51, R53, F54, V56, A57, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76.

[172] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC связывается с R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, Q59, T60, P61 и R73 из SEQ ID NO: 157.

[173] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC связывается с P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76 из SEQ ID NO: 157.

[174] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC связывается с G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, R51, R53, F54 и V56 из SEQ ID NO: 157.

[175] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC связывается с S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, A57, Q59, T60, P61, A72, R73 и E75 из SEQ ID NO: 157.

[176] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано на всем протяжении данного документа.

[177] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент.

[178] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC и связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF находятся в формате, выбранном из перечня, состоящего из выделенного антитела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и scFv.

[179] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC представляет собой Fab к BTC, и связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой Fab к VEGF.

[180] В одном аспекте Fab к BTC содержит тяжелую цепь (HA) и легкую цепь (LA), и при этом Fab к VEGF содержит тяжелую цепь (HB) и легкую цепь (LB).

[181] В одном аспекте HA и HB связаны в формате от N-конца к C-концу: N-HA-линкер-1-HB-C, и при этом LA и LB связаны в формате от N-конца к C-концу: N-LA-линкер-2-LB-C.

[182] В одном аспекте HA и HB соединены в формате от N-конца к C-концу: N-HB-линкер-1-HA-C, и где LA и LB связаны в формате, от N-конца к C-концу: N-LB-линкер 2-LA-C.

[183] В одном аспекте линкер 1 и линкер 2 содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 118.

[184] В одном аспекте линкер 1 и линкер 2 кодируются нуклеиновой последовательностью под SEQ ID NO: 119.

[185] В одном аспекте линкер 1 и линкер 2 содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 161-167.

[186] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под

SEQ ID NO: 1, 2, 3, 14, 15 и 16, соответственно; SEQ ID NO: 4, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно; SEQ ID NO: 5, 6, 3, 17, 18 и 19 соответственно или SEQ ID NO: 7, 8, 9, 20, 18 и 16 соответственно.

[187] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно.

[188] В одном аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 116 и 122 соответственно.

[189] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 25, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно; SEQ ID NO: 28, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно; SEQ ID NO: 29, 30, 27, 41, 42 и 43 соответственно или SEQ ID NO: 31, 32, 33, 44, 42 и 40 соответственно.

[190] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно.

[191] В одном аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 127 и 132 соответственно.

[192] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 25, 49, 50, 58, 59 и 60, соответственно; SEQ ID NO: 28, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно; SEQ ID NO: 29, 51, 50, 61, 62 и 63 соответственно или SEQ ID NO: 31, 52, 53, 64, 62 и 60 соответственно.

[193] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно.

[194] В одном аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 137 и 142 соответственно.

[195] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 69, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно; SEQ ID NO: 72, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно; SEQ ID NO: 73, 74, 71, 85, 18 и 86 соответственно или SEQ ID NO: 75, 76, 77, 87, 18 и 84 соответственно.

[196] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

[197] В одном аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 147 и 151 соответственно.

[198] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 92, 93 и 94

соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 105, 106 и 107 соответственно.

[199] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 95, 93 и 94 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 105, 106 и 107 соответственно.

[200] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 96, 97 и 94 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 108, 109 и 110 соответственно.

[201] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 98, 99 и 100 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 111, 109 и 107 соответственно.

[202] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[203] В одном аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[204] В одном аспекте различия в аминокислотной последовательности представляют собой консервативные замены.

[205] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[206] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 102 и 113 соответственно.

[207] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 117 и 123 соответственно.

[208] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 128 и 133 соответственно.

[209] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 138 и 143 соответственно.

[210] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 148 и 152 соответственно.

[211] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 103 и 114 соответственно.

[212] В одном аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 104 и 115 соответственно.

[213] В настоящем изобретении предусмотрена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит переменный домен тяжелой цепи (VHA) и переменный домен легкой цепи (VLA), которые связываются с BTC, и при этом связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит переменный домен тяжелой цепи (VHB) и переменный домен легкой цепи (VLB), которые связываются с VEGF, при этом:

VHA и VLA содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно, и

VHB и VLB содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[214] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1A) и константный домен легкой цепи (СКА), и где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1B) и константный домен легкой цепи (СКВ).

[215] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представлена в формате от N-конца до C-конца следующим образом: N-VHA-CH1A-линкер-VHB-CH1B-C и N-VLA-СКА-линкер-VLB-СКВ-C.

[216] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит тяжелую цепь, содержащую VHA, CH1A, линкер, VHB и CH1B, где тяжелая цепь представлена под SEQ ID NO: 120.

[217] В одном аспекте тяжелая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 121.

[218] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит легкую цепь, содержащую VLA, СКА, линкер, VLB и СКВ, где легкая цепь представлена под SEQ ID NO: 125.

[219] В одном аспекте легкая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 126.

[220] В настоящем изобретении также предусмотрена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF,

где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит переменный домен тяжелой цепи (VHA) и переменный домен легкой цепи (VLA), которые связываются с BTC, и при этом связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF, содержит переменный домен тяжелой цепи (VHB) и переменный домен легкой цепи (VLB), которые связываются с VEGF, при этом:

VHA и VLA содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно, и

VHB и VLB содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[221] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1A) и константный домен легкой цепи (CKA), и где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1B) и константный домен легкой цепи (CKB).

[222] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представлена в формате от N-конца до C-конца следующим образом: N-VHA-CH1A-линкер-VHB-CH1B-C и N-VLA-CKA-линкер-VLB-CKB-C.

[223] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит тяжелую цепь, содержащую VHA, CH1A, линкер, VHB и CH1B, где тяжелая цепь представлена под SEQ ID NO: 130.

[224] В одном аспекте тяжелая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 131.

[225] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит легкую цепь, содержащую VLA, CKA, линкер, VLB и CKB, где легкая цепь представлена под SEQ ID NO: 135.

[226] В одном аспекте легкая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 136.

[227] В настоящем изобретении также предусмотрена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит переменный домен тяжелой цепи (VHA) и переменный домен легкой цепи (VLA), которые связываются с BTC, и при этом связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит переменный домен тяжелой цепи (VHB) и переменный домен легкой цепи (VLB), которые связываются с VEGF, где:

VHA и VLA содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно, и

VHB и VLB содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[228] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к

ВТС дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (СН1А) и константный домен легкой цепи (СКА), и где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (СН1В) и константный домен легкой цепи (СКВ).

[229] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представлена в формате от N-конца до С-конца следующим образом: N-VHA-СН1А-линкер-VHB-СН1В-С и N-VLA-СКА-линкер-VLB-СКВ-С.

[230] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит тяжелую цепь, содержащую VHA, СН1А, линкер, VHB и СН1В, где тяжелая цепь представлена под SEQ ID NO: 140.

[231] В одном аспекте тяжелая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 141.

[232] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит легкую цепь, содержащую VLA, СКА, линкер, VLB и СКВ, где легкая цепь представлена под SEQ ID NO: 145.

[233] В одном аспекте легкая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 146.

[234] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, где связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит переменный домен тяжелой цепи (VHA) и переменный домен легкой цепи (VLA), которые связываются с ВТС, и при этом связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит переменный домен тяжелой цепи (VHB) и переменный домен легкой цепи (VLB), которые связываются с VEGF, при этом:

VHA и VLA содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно, и

VHB и VLB содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[235] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (СН1А) и константный домен легкой цепи (СКА), и где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (СН1В) и константный домен легкой цепи (СКВ).

[236] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представлена в формате от N-конца до С-конца следующим образом: N-VHA-СН1А-линкер-VHB-СН1В-С и N-VLA-СКА-линкер-VLB-СКВ-С.

[237] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит тяжелую цепь, содержащую VHA, СН1А, линкер, VHB и СН1В, где тяжелая цепь

представлена под SEQ ID NO: 149.

[238] В одном аспекте тяжелая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 150.

[239] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит легкую цепь, содержащую VLA, СКА, линкер, VLB и СКВ, где легкая цепь представлена под SEQ ID NO: 154.

[240] В одном аспекте легкая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 155.

[241] В настоящем изобретении предусмотрена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 120, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 125.

[242] В одном аспекте первая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 121, и вторая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 126.

[243] В настоящем изобретении также предусмотрена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 130, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 135.

[244] В одном аспекте первая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 131, и вторая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 136.

[245] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 140, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145.

[246] В одном аспекте первая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 141, и вторая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 146.

[247] В настоящем изобретении также предусмотрена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 149, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 154.

[248] В одном аспекте первая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 150, и вторая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 155.

[249] В настоящем изобретении предусмотрен полинуклеотид, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие мультиспецифическую связывающую молекулу, как описано на всем протяжении данного документа.

[250] В настоящем изобретении также предусмотрена кассета экспрессии, содержащая полинуклеотид, как описано на всем протяжении данного документа.

[251] В настоящем изобретении также предусмотрен вектор, содержащий кассету экспрессии, как описано на всем протяжении данного документа.

[252] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, как описано на всем протяжении данного документа.

[253] В настоящем изобретении предусмотрен способ получения мультиспецифической связывающей молекулы, включающий культивирование клетки-хозяина в подходящих условиях для экспрессии мультиспецифической связывающей молекулы или ее фрагмента.

[254] В одном аспекте способ дополнительно включает проведение очистки мультиспецифической связывающей молекулы.

[255] В настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество мультиспецифической связывающей молекулы, как описано на всем протяжении данного документа.

[256] В одном аспекте фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.

[257] В одном аспекте фармацевтическая композиция дополнительно содержит одно или несколько терапевтических средств.

[258] В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения офтальмологического нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы или фармацевтической композиции, как описано на всем протяжении данного документа.

[259] В одном аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу или фармацевтическую композицию вводят субъекту интравитреально.

[260] В одном аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу или фармацевтическую композицию вводят посредством субретинальной инъекции.

[261] В одном аспекте офтальмологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной глаукомы, диабетической ретинопатии, макулярного отека, патологической миопии, окклюзий вен сетчатки, ретинопатии недоношенных, аномальной пролиферации сосудов, ассоциированной с факоматозами.

[262] В одном аспекте офтальмологическое нарушение представляет собой диабетический макулярный отек.

[263] В настоящем изобретении предусмотрен способ предупреждения, лечения

или контроля офтальмологического нарушения, включающий введение субъекту эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы, описанной в настоящем изобретении, где мультиспецифическая связывающая молекула уменьшает утечку жидкости из сетчатки и/или утолщение сетчатки у субъекта относительно контрольного субъекта.

[264] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен набор, содержащий мультиспецифическую связывающую молекулу или фармацевтическую композицию, как описано на всем протяжении данного документа.

[265] В одном аспекте набор дополнительно содержит инструкция по применению.

[266] В одном аспекте набор дополнительно содержит шприц.

[267] В настоящем изобретении предусмотрен способ предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, неоваскулярной AMD или RVO у субъекта, нуждающегося в этом, включающий интравитреальное введение субъекту мультиспецифической связывающей молекулы, описанной в данном документе, в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,25 мг/глаз до 7,5 мг/глаз.

[268] В одном аспекте доза составляет приблизительно 0,25 мг/глаз, 0,75 мг/глаз, 2,5 мг/глаз или 7,5 мг/глаз.

[269] В одном аспекте доза составляет 0,25 мг/глаз.

[270] В одном аспекте доза составляет 0,75 мг/глаз.

[271] В одном аспекте доза составляет 1 мг/глаз.

[272] В одном аспекте доза составляет 2,5 мг/глаз.

[273] В одном аспекте доза составляет 3 мг/глаз.

[274] В одном аспекте доза составляет 5 мг/глаз.

[275] В одном аспекте доза составляет 7,5 мг/глаз.

[276] В одном аспекте доза составляет 0,25 мг/глаз, 0,3 мг/глаз, 0,35 мг/глаз, 0,4 мг/глаз, 0,45 мг/глаз, 0,5 мг/глаз, 0,55 мг/глаз, 0,6 мг/глаз, 0,65 мг/глаз, 0,7 мг/глаз, 0,75 мг/глаз, 0,8 мг/глаз, 0,85 мг/глаз, 0,9 мг/глаз, 0,95 мг/глаз, 1,0 мг/глаз, 1,1 мг/глаз, 1,2 мг/глаз, 1,3 мг/глаз, 1,4 мг/глаз, 1,5 мг/глаз, 1,6 мг/глаз, 1,7 мг/глаз, 1,8 мг/глаз, 1,9 мг/глаз, 2,0 мг/глаз, 2,1 мг/глаз, 2,2 мг/глаз, 2,3 мг/глаз, 2,4 мг/глаз, 2,5 мг/глаз, 2,6 мг/глаз, 2,7 мг/глаз, 2,8 мг/глаз, 2,9 мг/глаз, 3,0 мг/глаз, 3,1 мг/глаз, 3,2 мг/глаз, 3,3 мг/глаз, 3,4 мг/глаз, 3,5 мг/глаз, 3,6 мг/глаз, 3,7 мг/глаз, 3,8 мг/глаз, 3,9 мг/глаз, 4,0 мг/глаз, 4,1 мг/глаз, 4,2 мг/глаз, 4,3 мг/глаз, 4,4 мг/глаз, 4,5 мг/глаз, 4,6 мг/глаз, 4,7 мг/глаз, 4,8 мг/глаз, 4,9 мг/глаз, 5,0 мг/глаз, 5,1 мг/глаз, 5,2 мг/глаз, 5,3 мг/глаз, 5,4 мг/глаз, 5,5 мг/глаз, 5,6 мг/глаз, 5,7 мг/глаз, 5,8 мг/глаз, 5,9 мг/глаз, 6,0 мг/глаз, 6,1 мг/глаз, 6,2 мг/глаз, 6,3 мг/глаз, 6,4 мг/глаз, 6,5 мг/глаз, 6,6 мг/глаз, 6,7 мг/глаз, 6,8 мг/глаз, 6,9 мг/глаз, 7,0 мг/глаз, 7,1 мг/глаз, 7,2 мг/глаз, 7,3 мг/глаз, 7,4 мг/глаз или 7,5 мг/глаз.

[277] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит 1) связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно, и 2) связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, содержащую

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[278] В другом аспекте введение осуществляется один раз в месяц.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[279] В целом, настоящее изобретение частично основано на открытии антител, специфических в отношении бетацеллюлина (BTC). В частности авторы настоящего изобретения обнаружили антитела к BTC, характеризующиеся свойствами, совместимыми с терапевтической применимостью (т. е. антитела связывают BTC с аффинностью и специфичностью, достаточными для достижения желаемого терапевтического эффекта). Частично основываясь на этом открытии в настоящем изобретении описаны терапевтические композиции, предусматривающие молекулы, предусматривающие антитело или фрагмент антитела, специфические в отношении BTC, присоединенные к другому терапевтическому компоненту, например, антителу к VEGF или фрагменту антитела. Такие терапевтические компоненты включают антитела или их фрагменты и белки, которые связываются с терапевтическими мишенями в тканях, содержащих BTC (например, в стекловидном теле), а также соединения (например, низкомолекулярные соединения), которые модулируют терапевтические мишени в таких тканях. В случаях, где такие терапевтические компоненты включают антитела, терапевтическая композиция в целом может представлять собой полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело). В конкретных аспектах в данном документе также предусмотрены способы лечения нарушения со стороны глаз (например, AMD, например, невазкулярной AMD, DME, DR и т. п.) с помощью введения антагониста на основе антитела к BTC и антагониста на основе антитела к VEGF.

Терминология

[280] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Любые литературные источники, процитированные в данном документе, включая, например, все патенты, опубликованные заявки на патент и непатентные публикации, включены посредством ссылки в их полном объеме. Для облегчения понимания настоящего изобретения несколько терминов и аббревиатур, применяемых в данном документе, определены ниже следующим образом.

[281] Применяемые в данном документе формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если содержание явно не указывает на иное. Так, например, ссылка на "антитело" включает смесь двух или более таких антител.

[282] Если иное специально не указано или не очевидно из контекста, то применяемый в данном документе термин "приблизительно" в отношении числового значения понимают как находящийся в пределах диапазона допустимой погрешности в данной области техники, например, в пределах двух стандартных отклонений от среднего. Таким образом, "приблизительно" может находиться в пределах +/- 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,1%, 0,05% или 0,01% от указанного значения, предпочтительно +/-

10% от указанного значения. В случае применения перед числовым диапазоном или перечнем чисел термин "приблизительно" применяется к каждому числу в сериях, например, фразу "приблизительно 1-5" следует интерпретировать как "приблизительно 1 - приблизительно 5", или, например, фразу "приблизительно 1, 2, 3, 4" следует интерпретировать как "приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4 и т. д."

[283] Во всех случаях, когда термин "содержать", "содержит", "содержащий" или тому подобные применяются в отношении последовательности (например, аминокислотной последовательности), следует понимать, что указанная последовательность также может быть ограничена термином "состоять", "состоит", "состоящий" или тому подобное. Применяемая в данном документе фраза "состоящий по существу из" относится к родам или видам активных фармацевтических средств, включенных в способ или композицию, а также любым вспомогательным веществам, не проявляющим активность в отношении намеченной цели применения способов или композиций. В некоторых аспектах фраза "состоящий по существу из" однозначно исключает включение одного или нескольких дополнительных активных средств, отличных от мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению. В некоторых аспектах фраза "состоящий по существу из" однозначно исключает включение одного или нескольких дополнительных активных средств, отличных от мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению, и второго средства, вводимого совместно.

[284] Термин "бетацеллюлин" или "BTC" относится к фактору роста семейства EGF в организме. Активность BTC может быть измерена с помощью его связывания с 1) ErbB1; 2) ErbB4; 3) гомодимером ErbB (например, ErbB1/ErbB1 и ErbB4/ErbB4) и/или 4) гетеродимером ErbB (например, ErbB1/ErbB2, ErbB1/ErbB3, ErbB1/ErbB4, ErbB2/ErbB3 и ErbB2/ErbB4). См. Dunbar and Goddard, *Int'l. J. Biochem. & Cell Biol.*, 2000, 32: 805-815. Активность BTC также может быть измерена по уровню фосфорилирования ERK1/2. У людей он кодируется геном BTC, расположенным на хромосоме 4 в локусе 4q13-q21. BTC человека экспрессируется в виде белка из 178 остатков как про-BTC (например, NCBI: NP_001720.1 или SEQ ID NO: 156). Зрелый, секретлируемый BTC человека состоит из 80 аминокислотных остатков, т. е., остатков 32-111 про-BTC, представленных под SEQ ID NO: 158. Бетацеллюлин мыши состоит из 177 аминокислотных остатков (например, NCBI: NP_031594.1). Бетацеллюлин крысы состоит из 177 аминокислотных остатков (например, NCBI: GenBank: BAA96731.1).

[285] Термин "фактор роста эндотелия сосудов" или "VEGF" относится к белку, характеризующемуся активностью VEGF в организме, например, он индуцирует пролиферацию и миграцию клеток эндотелия сосудов, и может быть необходим как для физиологического, так и патологического ангиогенеза. У млекопитающих семейство VEGF предусматривает пять представителей: VEGF-A, фактор роста плаценты (PGF), VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D. VEGF человека существует в по меньшей мере шести

изоформах (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ и VEGF₂₀₆), которые возникают в результате альтернативного сплайсинга мРНК одного гена (Ferrara N, Davis Smyth T. *Endocr Rev* 18:1-22 (1997)). VEGF₁₆₅, наиболее распространенная изоформа, представляет собой основной, связывающий гепарин, димерный гликопротеин с молекулярной массой, составляющей приблизительно 45000 дальтон. Термин "VEGF человека", применяемый в данном документе, относится к фактору роста клеток эндотелия сосудов человека, состоящему из 165 аминокислот, и связанным с ними аминокислотным факторам роста клеток эндотелия сосудов, состоящим из 121, 189 и 206 (и другим изоформам), как описано у Leung et al., *Science* 246:1306 (1989), и Houck et al., *Mol. Endocrin.* 5:1806 (1991), вместе со встречающимися в природе аллельными и повергнутыми процессингу формами этих факторов роста.

[286] Термин "связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС", применяемый в данном документе, означает полипептид (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), который специфически связывается с ВТС. Во избежание любых сомнений неограничивающие примеры "связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС" включают полноразмерные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, такие как Fab, scFv, Fv, однодоменные антитела и т. п. В конкретном аспекте антитело к ВТС представляет собой Fab или scFv. В конкретном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС специфически связывается с ВТС человека и/или ВТС яванского макака.

[287] Термин "связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF", применяемый в данном документе, означает полипептид (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент как представлено ниже), который специфически связывается с VEGF (как определено ниже). Во избежание любых сомнений, неограничивающие примеры "связывающей функциональной единицы на основе антитела к VEGF" включают полноразмерные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, такие как Fab, scFv, Fv, однодоменные антитела и т. п., как представлено ниже. В конкретном аспекте антитело к VEGF представляет собой Fab или scFv. В конкретном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF специфически связывается с VEGF-А человека.

[288] Фраза "связывает специфически", "специфически связывает" или "селективно связывает", когда она применяется в контексте описания взаимодействия между антигеном (например, белком) и мультиспецифической связывающей молекулой по настоящему изобретению, относится к реакции связывания, которая является определяющей для установления присутствия антигена в гетерогенной популяции белков и других биологических веществ, например, в биологическом образце, например, крови, сыворотке крови, плазме крови или образце ткани. Таким образом, при определенных обозначенных условиях проведения иммунологического анализа мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению, характеризующаяся конкретной специфичностью связывания, связываются с конкретным антигеном в по меньшей мере

два раза сильнее по сравнению с фоновым уровнем и по существу не связываются в значительном количестве с другими антигенами, присутствующими в образце. В одном аспекте при обозначенных условиях иммунологического анализа мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению с конкретной специфичностью связывания связывается с конкретным антигеном в по меньшей мере десять (10) раз сильнее относительно фонового уровня, и по существу не связывается в значительном количестве с другими антигенами, присутствующими в образце. Специфическое связывание с антителом или связывающим средством в таких условиях может предусматривать то, что мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению должна отбираться по ее специфичности в отношении конкретного белка. При желании или необходимости данный отбор можно проводить путем исключения мультиспецифических связывающих молекул, которые вступают в перекрестные реакции с молекулами от другого вида (например, мыши или крысы) или других подтипов.

[289] В некоторых аспектах специфическое связывание мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению означает связывание с константой равновесия (K_A) (k_{on}/k_{off}), составляющей по меньшей мере $10^2 M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^2 M^{-1}$, по меньшей мере $10^3 M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^3 M^{-1}$, по меньшей мере $10^4 M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^4 M^{-1}$, по меньшей мере $10^5 M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^5 M^{-1}$, по меньшей мере $10^6 M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^6 M^{-1}$, по меньшей мере $10^7 M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^7 M^{-1}$, по меньшей мере $10^8 M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^8 M^{-1}$, по меньшей мере $10^9 M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^9 M^{-1}$, по меньшей мере $10^{10} M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^{10} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{11} M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^{11} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{12} M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^{12} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{13} M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^{13} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{14} M^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^{14} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{15} M^{-1}$ или по меньшей мере $5 \times 10^{15} M^{-1}$.

[290] В некоторых аспектах специфическое связывание мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению означает связывание с константой скорости (K_D) (k_{off}/k_{on}), составляющей менее $5 \times 10^{-2} M$, менее $10^{-2} M$, менее $5 \times 10^{-3} M$, менее $10^{-3} M$, менее $5 \times 10^{-4} M$, менее $10^{-4} M$, менее $5 \times 10^{-5} M$, менее $10^{-5} M$, менее $5 \times 10^{-6} M$, менее $10^{-6} M$, менее $5 \times 10^{-7} M$, менее $10^{-7} M$, менее $5 \times 10^{-8} M$, менее $10^{-8} M$, менее $5 \times 10^{-9} M$, менее $10^{-9} M$, менее $5 \times 10^{-10} M$, менее $10^{-10} M$, менее $5 \times 10^{-11} M$, менее $10^{-11} M$, менее $5 \times 10^{-12} M$, менее $10^{-12} M$, менее $5 \times 10^{-13} M$, менее $10^{-13} M$, менее $5 \times 10^{-14} M$, менее $10^{-14} M$, менее $5 \times 10^{-15} M$ или менее $10^{-15} M$ или меньше, и связывается с антигеном-мишенью с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше ее аффинности для связывания с неспецифическим антигеном (например, HSA).

[291] Термин " K_D " или " Kd " относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

[292] Термин "функциональная единица, связывающая терапевтическую мишень", применяемый в данном документе, означает молекулу, которая специфично связывает представляющую интерес терапевтическую мишень. Данная молекула может

представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (как указано ниже), антигенспецифическую связывающую функциональную единицу, такую как DARPIn, финомер, аффитело, аднектин, аффилин, антикалин, авимер, центирин или молекула РНК, такая как аптамер. Данная функциональная единица, связывающая терапевтическую мишень, также может представлять собой полипептид, такой как рецептор или часть рецептора, которые специфично связывают представляющую интерес терапевтическую мишень. Во избежание любых сомнений, неограничивающие примеры "связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС" включают полноразмерные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, такие как Fab, scFv, Fv, однодоменные антитела и т. п., как представлено ниже.

[293] Термин "антитело", применяемый в данном документе, относится к полному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту. Полное антитело представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой посредством дисульфидных связей. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращено в данном документе как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращено в данном документе как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. VH- и VL-области могут быть дополнительно подразделены на гипервариабельные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител способны опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе с различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классического пути активации системы комплемента. Термин "антитело" включает без ограничения моноклональные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, камелизированные антитела, химерные антитела, биспецифические или мультиспецифические антитела. Антитела могут относиться к любому изотипу/классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или подклассу (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂).

[294] Термин "изотип" относится к классу антитела (например, IgM, IgE, IgG, такой как IgG₁ или IgG₄), который обеспечивается генами константной области тяжелой цепи. Изотип также включает модифицированные варианты одного из этих классов, в которых были осуществлены модификации с целью изменения функции Fc, например, для усиления или снижения эффекторных функций или связывания с Fc-рецепторами. Антитела могут относиться к любому изотипу (например, иммуноглобулину G (IgG)),

иммуноглобулину E (IgE), иммуноглобулину M (IgM), иммуноглобулину D (IgD), иммуноглобулину A (IgA) и иммуноглобулину Y (IgY)), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу. Термин "IgG" или "антитело IgG", применяемый в данном документе, и если не указано иное, означает полное антитело типа G или Ig.

[295] Термин "легкая цепь" включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты с достаточной последовательностью вариабельной области для придания специфичности связывания. Полноразмерная легкая цепь включает домен вариабельной области V_L и домен константной области C_L . Домен вариабельной области легкой цепи находится на аминоконце полипептида. Легкие цепи включают каппа-цепи и лямбда-цепи.

[296] Термин "тяжелая цепь" включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты с достаточной последовательностью вариабельной области для придания специфичности связывания. Полноразмерная тяжелая цепь включает домен вариабельной области V_H и три домена константной области C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Домен V_H находится на аминоконце полипептида, и домены C_H находятся на карбоксильном конце, при этом C_{H3} находится ближе всех к карбоксильному концу полипептида. Тяжелые цепи могут иметь любой изотип, в том числе IgG (в том числе подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (в том числе подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

[297] Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к части легких и/или тяжелых цепей антитела, как правило включающей примерно 120-130 аминоконцевых аминокислот в тяжелой цепи и приблизительно 100-110 аминоконцевых аминокислот в легкой цепи. В некоторых аспектах вариабельные области разных антител сильно различаются по аминокислотным последовательностям, даже среди антител одного вида. Вариабельная область антитела, как правило, определяет специфичность конкретного антитела к его мишени.

[298] Термины "определяющая комплементарность область" и "CDR", используемые в данном документе, относятся к последовательностям аминокислот в вариабельных областях антитела, которые придают антигенную специфичность и аффинность связывания. В целом, в каждой вариабельной области тяжелой цепи присутствуют три CDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и в каждой вариабельной области легкой цепи присутствуют три CDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3). Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR могут быть определены с применением любой из ряда хорошо известных схем, в том числе описанных Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации по "Kabat"); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273927-948 (схема нумерации по "Chothia"); и Lefranc et al., (2003) Dev. Comp. Immunol. 27, 55-77 (схема нумерации по "IMGT"). Определение по Kabat является стандартом для нумерации остатков в антителе и, как правило, применяется для идентификации участков CDR. См., например, Johnson & Wu, Nucleic Acids Res., 28: 214-8 (2000). Определение по Chothia подобно определению по Kabat, но определение по Chothia учитывает положение определенных областей структурной петли. См., например,

Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901-17 (1986); Chothia et al., Nature, 342: 877-83 (1989).

[299] В качестве альтернативы могут быть применены другие методы установление границ областей CDR, например, определения CDR как по Kabat, так и по Chothia можно комбинировать ("комбинированная" система). Например, в случае классических форматов согласно Kabat аминокислотные остатки CDR в домене тяжелой вариабельной цепи (VH) нумеруют 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); а аминокислотные остатки CDR в домене легкой вариабельной цепи (VL) нумеруют 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Согласно Chothia аминокислоты CDR в VH пронумерованы 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3), и аминокислотные остатки в VL пронумерованы 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). При комбинировании определений CDR как по Kabat, так и по Chothia объединенные CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH человека и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL человека. В качестве другого примера согласно IMGT аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене тяжелой цепи (VH) нумеруются 26-33 (HCDR1), 51-58 (HCDR2) и 97-108 (HCDR3), и аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене легкой цепи (VL) нумеруются 27-36 (LCDR1), 54-56 (LCDR2) и 93-101 (LCDR3).

[300] Применяемый в данном документе термин "каркасные области антитела" или "FR" относится к части вариабельного домена, либо VL, либо VH, которая служит в качестве остова для антигенсвязывающих петель (CDR) данного вариабельного домена. По существу он представляет собой вариабельный домен без CDR. Согласно IMGT области CDR антитела можно определять с применением программы IMGT/DomainGap Align.

[301] Термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, применяемый в данном документе, относится к одному или нескольким фрагментам антитела или одному или нескольким полипептидам, включающим такой фрагмент, который сохраняют способность специфически связываться с данным антигеном (например, ВТС и VEGF). Антигенсвязывающие функции антитела могут выполняться фрагментами интактного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином антигенсвязывающий фрагмент антитела, включают без ограничения Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; F(ab)₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных посредством дисульфидного мостика в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH; одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv), состоящий из доменов VL и VH, связанных линкерной последовательностью, и фрагмент однодоменного антитела (dAb) (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546), который состоит из домена VH или домена VL. Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть включены в однодоменные антитела, макситела, минитела, интратела, диатела, триатела, тетратела, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136). Антигенсвязывающие части антител могут быть привиты на остовы на основе

полипептидов, таких как фибронектин типа III (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описаны моноклоналы на основе полипептида фибронектина). Связывающие фрагменты антител могут быть включены в состав одноцепочечных молекул, содержащих пару тандемных Fv-сегментов (например, V_H-CH1- V_H -CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи (например, V_L-VC-V_L-VC) образуют пару антигенсвязывающих областей (Zapata et al., (1995) Protein Eng. 8:1057-1062 и патент США № 5641870).

[302] "Fab"-фрагмент, применяемый в данном документе, содержит один константный и один переменный домен каждой из тяжелой и легкой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab может не образовывать дисульфидную связь с другой тяжелой цепью молекулы.

[303] "Fab'-фрагмент", применяемый в данном документе, содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая содержит домен V_H и домен C_{H1}, и также область между доменами C_{H1} и C_{H2}, так что между тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов может образовываться межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы F(ab')₂.

[304] "F(ab')₂-фрагмент", применяемый в данном документе, содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами C_{H1} и C_{H2}, так что между двумя тяжелыми цепями образуется дисульфидная связь. Таким образом F(ab')₂-фрагмент состоит из двух Fab'-фрагментов, которые удерживаются вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями.

[305] "Fv-область" содержит переменные области как тяжелых, так и легких цепей, но не содержит константных областей.

[306] Применяемый в данном документе термин "одноцепочечный Fv" или "scFv" относится к фрагментам антител, которые содержат домены V_H и V_L антитела, где эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Предпочтительно полипептид Fv дополнительно содержит внутренний полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, который обеспечивает возможность scFv образовывать необходимую структуру для связывания антигена. scFv может также иметь сконструированный внутренний дисульфидный мостик, который повышает стабильность. Для обзора scFv см. Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., 1994, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315. В предпочтительных аспектах scFv, применяемые в мультиспецифических связывающих молекулах по настоящему изобретению, характеризуются общими структурами: NH₂-V_L-линкер-V_H-COOH или NH₂-V_H-линкер-V_L-COOH.

[307] Термин "антитело с созревшей аффинностью", применяемый в данном документе, представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких его CDR, которые приводят к улучшению аффинности антитела к антигену, по сравнению с исходным антителом, которое не обладает таким изменением(изменениями). Предпочтительные антитела с созревшей аффинностью будут

характеризоваться наномолярной или даже пикомолярной аффинностью к целевому антигену. Антитела с созревшей аффинностью получают с помощью процедур, известных из уровня техники. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описывает созревание аффинности путем перестановки доменов VH и VL. Случайный мутагенез CDR и/или остатков каркасной области описан в Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

[308] Термин "исходное" антитело, применяемый в данном документе, представляет собой антитело, которое кодируется аминокислотной последовательностью, применяемой для получения антитела с созревшей аффинностью или его варианта. Предпочтительно исходное антитело содержит человеческую каркасную область и, если присутствует, содержит человеческую(человеческие) константную(константные) область(области) человеческого антитела. Например, исходное антитело может представлять собой гуманизированное или человеческое антитело.

[309] Термин "диатело", применяемый в данном документе, относится к небольшим фрагментам антитела с двумя антигенсвязывающими сайтами, чьи фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) в той же полипептидной цепи (VH-VL). При применении линкера, который является слишком коротким чтобы обеспечить возможность сопряжения между двумя доменами на одной цепи, домены вынуждены сопрягаться с комплементарными доменами другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих сайта. Диатела описаны более подробно, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448.

[310] Термин "моноспецифическая связывающая молекула" или "моноспецифическое антитело", применяемый в данном документе, относится к молекуле, которая связывается с одним эпитопом на антигене-мишени. В одном аспекте моноспецифическая связывающая молекула или моноспецифическое антитело по настоящему изобретению связывается с B7. В другом аспекте моноспецифическая связывающая молекула или моноспецифическое антитело по настоящему изобретению связывается с VEGF.

[311] Термин "мультиспецифическая связывающая молекула" или "мультиспецифическое антитело", применяемый в данном документе, относится к молекуле, которая связывается с двумя или несколькими разными антигенами. Распознавание каждого антигена в общем осуществляется с помощью "антигенсвязывающего домена" (например, "антигенсвязывающего домена B7", "антигенсвязывающего домена VEGF"). Термин "мультиспецифический" включает "биспецифический," т. е. молекулу, которая связывается с двумя разными антигенами. В некоторых аспектах мультиспецифическая связывающая молекула содержит одну или несколько полипептидных цепей, каждая из которых содержит один антигенсвязывающий

домен. В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит VH или VL. В некоторых аспектах мультиспецифическая связывающая молекула содержит одну или несколько полипептидных цепей, каждая из которых содержит более одного (например, два) антигенсвязывающего домена. В некоторых аспектах мультиспецифические связывающие молекулы содержат две, три, четыре или более полипептидных цепей, которые вместе содержат множество, например два или более, например, два, три или четыре антигенсвязывающих доменов.

[312] Термин "биспецифическая связывающая молекула" или "биспецифическое антитело" относится к молекулам, в которых объединены антигенсвязывающие сайты двух антител в пределах одной молекулы. В одном аспекте биспецифическая связывающая молекула или биспецифическое антитело содержит один полипептид. В другом аспекте биспецифическая связывающая молекула или биспецифическое антитело содержат два полипептида, соединенные дисульфидными мостиками или любыми другими ковалентными связями. Таким образом, биспецифическое антитело способно связывать два разных антигена одновременно или последовательно. Способы получения биспецифических антител являются широко известными из уровня техники. Различные форматы объединения двух антител являются также известными из уровня техники. Формы биспецифических антител по настоящему изобретению включают без ограничения диатело, одноцепочечное диатело, продукт димеризации Fab (Fab-Fab), Fab-scFv и тандемное антитело, как известно специалистам в данной области техники.

[313] Термин "бивалентная молекула", применяемый в данном документе, относится к молекуле, которая имеет два антигенсвязывающих домена. Термин "трехвалентная молекула", применяемый в данном документе, относится к молекуле, которая имеет три антигенсвязывающих домена. В некоторых аспектах трехвалентная молекула по настоящему изобретению представляет собой молекулу, подобную трехвалентному антителу. В некоторых аспектах трехвалентная молекула может состоять из двух антигенсвязывающих доменов, способных к связыванию с одним и тем же эпитопом одного и того же антигена, и третьего антигенсвязывающего домена, который связывается с отдельным антигеном. Такие аспекты считаются трехвалентными биспецифическими молекулами.

[314] Термин "мультивалентная молекула" относится к молекуле, которая имеет по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, где антигенсвязывающие сайты могут характеризоваться специфичностью к одному и тому же антигену или к разным антигенам. В некоторых аспектах мультивалентная молекула по настоящему изобретению представляет собой молекулу, подобную мультивалентному антителу. В некоторых аспектах мультивалентная молекула по настоящему изобретению представляет собой мультивалентное антитело. В некоторых аспектах мультивалентная молекула представляет собой бивалентную молекулу, трехвалентную молекулу или тетравалентную молекулу. Тримеризующий домен описан, например, в EP 1012280B1. Пентамеризующие модули описаны, например, в PCT/EP97/05897.

[315] Термин "по существу подобный" или "по существу такой же", применяемый в данном документе, относится к достаточно высокому уровню сходства между двумя числовыми значениями (обычно одно связано с антителоподобной молекулой по настоящему изобретению и другое связано с эталонным/сравнительным антителом или антителоподобной молекулой) так, что специалист в данной области техники сочтет разницу между двумя значениями незначительной или не имеющей биологической и/или статистической значимости в контексте биологической характеристики, измеренной указанными значениями (например, значения T_m или количество собранных антител). Различие между указанными двумя значениями предпочтительно составляет менее приблизительно 50%, предпочтительно менее приблизительно 40%, предпочтительно менее приблизительно 30%, предпочтительно менее приблизительно 20%, предпочтительно менее приблизительно 10% в зависимости от функции значения для эталонного/сравнительного антитела.

[316] Термин "антиген" относится к молекуле или к части молекулы, способной быть связанной селективным связывающим средством, таким как антигенсвязывающий белок (включая, например, антитело или его иммунологический функциональный фрагмент). В некоторых аспектах антиген способен использоваться в организме животного для выработки антител, способных к связыванию с этим антигеном. Антиген может обладать одним или несколькими эпитопами, способными к взаимодействию с разными антигенсвязывающими белками, например, антителами.

[317] Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта", применяемый в данном документе, относится к любой детерминанте способной к связыванию с высокой аффинностью с антителом или антителоподобной молекулой. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается антителом (или антителоподобной молекулой), которое специфически целенаправленно воздействует на данный антиген, и в случае если антиген представляет собой белок, эпитоп включает в себя специфические аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антителом или антителоподобной молекулой. Наиболее часто эпитопы локализируются на белках, однако в некоторых случаях могут локализоваться на молекулах других типов, таких как нуклеиновые кислоты. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические характеристики заряда.

[318] В целом, мультиспецифические связывающие молекулы, специфичные в отношении конкретного антигена-мишени, будут преимущественно распознавать эпитоп в данном антигене-мишени в сложной смеси белков и/или макромолекул.

[319] Области данного полипептида, которые включают эпитоп, могут быть идентифицированы с применением множества методик картирования эпитопов, известных из уровня техники. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например,

линейные эпитопы могут быть определены, например, посредством параллельного синтеза больших количеств пептидов на твердых подложках, при этом пептиды соответствуют частям молекулы белка, и осуществления взаимодействия пептидов с антителами, когда пептиды все еще прикреплены к подложкам. Такие методики известны из уровня техники и описаны в, например, патенте США № 4708871; Geysen et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8:3998-4002; Geysen et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:78-182; Geysen et al., (1986) Mol. Immunol. 23:709-715. Аналогичным образом, конформационные эпитопы с легкостью идентифицируются посредством определения пространственной конформации аминокислот, как, например, посредством рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. См., например, Протоколы эпитопного картирования выше. Антигенные области белков также могут быть идентифицированы с применением стандартных графиков антигенности и гидропатичности, таких как графики, построенные с помощью, например, программного обеспечения Omega версии 1.0, доступной от Oxford Molecular Group. В этой компьютерной программе используется способ Хоппа/Вудса, Hopp et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824-3828; для определения профилей антигенности и методика Кайта-Дулиттла, Kyte et al., (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132; для графиков гидропатичности.

[320] Термин "конкурировать" при применении в контексте антигенсвязывающих белков, которые конкурируют за один эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими белками, определяемую анализом, в котором подлежащий исследованию антигенсвязывающий белок (например, антитело или его иммунологически функциональный фрагмент) препятствует или подавляет (например, уменьшает) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка (например, лиганда или эталонного антитела) с общим антигеном (например, ВТС или его фрагментом). Для определения, того конкурирует ли один антигенсвязывающий белок с другим, может применяться множество типов анализов конкурентного связывания, например, твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см., например, Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242-253); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см., например, Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-3619) твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см., например, Harlow и Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); твердофазный RIA с прямым мечением с применением метки I-125 (см., например, Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25:7-15); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см., например, Cheung, et al., 1990, Virology 176:546-552) и RIA с прямым мечением (Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82). Как правило, такой анализ включает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любой из них, немеченого тестируемого антигенсвязывающего белка и меченого эталонного антигенсвязывающего белка. Конкурентное подавление измеряется посредством определения количества метки,

связавшейся с твердой поверхностью или клетками в присутствии исследуемого антигенсвязывающего белка. Обычно исследуемый антигенсвязывающий белок присутствует в избытке. Антигенсвязывающие белки, идентифицируемые посредством конкурентного анализа (конкурирующие антигенсвязывающие белки), предусматривают антигенсвязывающие белки, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонные антигенсвязывающие белки, и антигенсвязывающие белки, связывающиеся со смежным эпитопом, который расположен достаточно близко к эпитопу, с которым связывается эталонный антигенсвязывающий белок, чтобы имело место стерическое затруднение. Дополнительные подробности, касающиеся способов определения конкурентного связывания, предусмотрены в примерах в данном документе. Обычно, когда конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он будет подавлять (например, уменьшать) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном на по меньшей мере 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или 75% или больше. В некоторых случаях, связывание подавляется на по меньшей мере 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97% или 97% или больше.

[321] Термины "полипептид" и "белок" применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Фразы также применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к полимерам из встречающихся в природе аминокислот и к полимеру из не встречающихся в природе аминокислот. Если не указано иное, конкретная полипептидная последовательность также потенциально охватывает ее варианты с консервативными модификациями.

[322] Применяемый в данном документе термин "полипептидная цепь" относится к полной аминокислотной цепи мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению, имеющей все составляющие области и домены.

[323] Термины "константная область" или "константный домен" относятся к карбоксиконцевой части легкой и тяжелой цепи, которая не вовлечена непосредственно в связывание антитела с антигеном, но проявляет различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Термины относятся к части молекулы иммуноглобулина, содержащей более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с другой частью иммуноглобулина, варибельным доменом, который содержит антигенсвязывающий сайт. Константный домен содержит домены СН1, СН2 и СН3 тяжелой цепи и домен СL легкой цепи.

[324] Термин "аминокислота" относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют подобно встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой такие аминокислоты, которые кодируются генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые позже модифицируются, например, расщепление гидроксипролина, γ -

карбоксиглутамата, пироглутамата, с-концевого лизина и О-фосфосерин, например, в результате посттрансляционных модификаций. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота, т. е. альфа-углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличающуюся от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют подобно встречающейся в природе аминокислоте.

[325] В случае полипептидных последовательностей "консервативно модифицированные варианты" включают отдельные замены, делеции или добавления в полипептидной последовательности, которые приводят в результате к замене аминокислоты на сходную по химическим свойствам аминокислоту. Таблицы консервативных замен, в которых приведены функционально сходные аминокислоты, хорошо известны. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют, а не исключают, полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели по настоящему изобретению. Следующие восемь групп содержат аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T) и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)). В некоторых аспектах термин "консервативные модификации последовательности" или "консервативные модификации" применяется для обозначения аминокислотных модификаций, которые не оказывают значительного влияния на характеристики связывания у антитела, содержащего аминокислотную последовательность, или не изменяют их.

[326] В некоторых аспектах, термин "доза" относится к количеству терапевтического средства, которое может представлять собой белок (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент) или нуклеиновую кислоту, или функциональную единицу, связывающую терапевтическую мишень, может представлять собой малую молекулу (например, < 900 дальтон) терапевтического соединения, вводимого субъекту за один раз (однократная доза) или за два или более введения в течение определенного интервала времени. Например, доза может относиться к количеству белка (например, антитела к ВТС или его функционального фрагмента, конъюгированного с молекулой, например, белком, содержащим антитело к VEGF или его функциональный фрагмент), вводимого субъекту на протяжении курса, составляющего три недели, или одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или более месяцев (например, с помощью одного введения или

двух или более введений). Интервал между дозами может быть любым желаемым количеством времени и называется "интервалом введения доз".

[327] Термин "фармацевтически эффективная" в отношении дозы означает достаточное количество белка (например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента) или другого фармацевтически активного средства для обеспечения желаемого эффекта (например, улучшение зрения или предупреждения дальнейшей потери зрения). Количество, которое является "эффективным" будет варьироваться от субъекта к субъекту в зависимости от возраста и общего состояния индивидуума, конкретного лекарственного средства или фармацевтически активного средства и т. п. Таким образом, не всегда возможно указать точное "эффективное" количество, применимое для всех пациентов. Однако, подходящая "эффективная" доза в любом отдельном случае может быть определена специалистом в данной области техники с применением обычных экспериментов.

[328] Термин "человеческое антитело", применяемый в данном документе, предполагает включение антител, содержащих переменные области, в которых как каркасная, так и CDR-области получены из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также получена из таких последовательностей человека, например, последовательностей зародышевой линии человека или мутантных версий последовательностей зародышевой линии человека или антитела, содержащего консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализа каркасных последовательностей человека, например, как описано у Knappik, et al. (J. Mol. Biol. 296, 57-86, 2000). Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*, или консервативное замещение для обеспечения стабильности или изготовления). Однако, термин "человеческое антитело", применяемый в данном документе, не предполагает включение антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты к человеческим каркасным последовательностям.

[329] Термин "моноклональное антитело" или "композиция на основе моноклонального антитела", применяемый в данном документе, относится к полипептидам, включая антитела и антигенсвязывающие фрагменты, имеющие по существу идентичную аминокислотную последовательность или полученные из того же генетического источника. Данный термин также включает препараты молекул антител одномолекулярной композиции. Композиция на основе моноклонального антитела проявляет одну специфичность и аффинность связывания в отношении конкретного эпитопа. Способы получения моноклональных антител с применением технологии фагового дисплея известны из уровня техники (Proetzel, G., Ebersbach, H. (Eds.) *Antibody Methods and Protocols*. Humana Press ISBN 978-1-61779-930-3; 2012).

[330] Термин "гуманизированные" формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляет собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Как правило, гуманизированные антитела являются иммуноглобулинами человека (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены остатками из гипервариабельной области вида, отличного от человека (донорное антитело), такого как мышь, крыса, кролик или примат, отличный от человека, обладающего желаемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которых нет в реципиентном антителе или в донорном антителе. Такие модификации вносятся для того, чтобы дополнительно улучшить характеристики антитела. В целом, гуманизированное антитело будет содержать по существу весь по меньшей мере один, а как правило два, вариабельных домена, в которых все или по существу все из гипервариабельных петель, соответствуют петлям иммуноглобулина, отличного от человеческого, и все или по существу все из FR представляют собой последовательности $I\alpha$ иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило константной области иммуноглобулина человека. Для получения более подробной информации см. Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). См. также следующие обзорные статьи и цитируемые в них ссылки: Vaswani и Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler и Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

[331] Применяемый в данном документе термин "идентичность" относится к совпадению последовательности между двумя полипептидами, молекулами или между двумя нуклеиновыми кислотами. Когда положение в обеих сравниваемых последовательностях занято одним и тем же основанием или аминокислотой (например, если положение в обоих полипептидах занято лизином), то соответствующие молекулы являются идентичными в этом положении. "Доля идентичности в процентах" между двумя последовательностями представляет собой функцию количества идентичных положений, общих для последовательностей, с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которое необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. В общем, сравнение проводится, когда две последовательности выровнены для обеспечения максимальной идентичности. Такое выравнивание может быть обеспечено с применением, например, способа по Needleman и Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), алгоритм которого был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG, с применением либо матрицы Blosum 62, либо матрицы PAM250 и веса гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность выступает в качестве эталонной

последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, если необходимо, устанавливают координаты подпоследовательностей, и устанавливают программные параметры алгоритма для анализа последовательности. Можно использовать программные параметры по умолчанию или можно установить альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает значения процентной идентичности последовательностей для тестируемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью, исходя из программных параметров. Может применяться окно сравнения, где ссылка на сегмент любого из числа смежных положений, выбранных из группы, состоящей из от 20 до 600, обычно от приблизительно 50 до приблизительно 200, более обычно от приблизительно 100 до приблизительно 150, в которых последовательность можно сравнить с эталонной последовательностью с таким же числом смежных позиций после того, как две последовательности будут оптимально выровнены. Способы выравнивания последовательностей для сравнения являются хорошо известными из уровня техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии согласно Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, с помощью алгоритма выравнивания гомологичных участков согласно Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, с помощью способа поиска сходства согласно Pearson and Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, с помощью компьютерных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в составе пакета программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мэдисон, Висконсин) или с помощью выравнивания в ручном режиме и визуального осмотра (см., например, Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003)). Два примера алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, представляют собой алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977; и Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990, соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным от Национального центра биотехнологической информации. Этот алгоритм предусматривает вначале идентификацию пар последовательностей с высокими баллами (HSP) посредством идентификации коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительно оцениваемому пороговому баллу T при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T известен под названием пороговый балл соседних слов (Altschul et al., выше). Эти первоначальные совпадения для соседних слов выступают в качестве "затравок" для начала поисков, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Совпадения для слов продлеваются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько может быть увеличен суммарный балл

выравнивания. В случае нуклеотидных последовательностей суммарные баллы рассчитывают с применением параметров M (вознаграждающий балл за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда <0). В случае аминокислотных последовательностей оценочную матрицу используют для расчета суммарного балла. Продление совпадений для слов в каждом направлении останавливается, когда суммарный балл выравнивания уменьшается на величину X относительно его максимального достигнутого значения; суммарный балл стремится к нулю или ниже вследствие накопления отрицательно оцениваемых выравниваний одного или нескольких остатков; или достигается конец любой из последовательностей. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) в качестве параметров по умолчанию применяется длина слова (W), составляющая 11, ожидание (E), составляющее 10, $M=5$, $N=-4$, и сравнение обеих нитей. В случае аминокислотных последовательностей, в программе BLASTP в качестве параметров по умолчанию используются длина слова 3, и ожидание (E) 10, и оценочная матрица BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989), выравнивания (B) 50, ожидание (E) 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993). Одной мерой сходства, предусмотренной в алгоритме BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая указывает на вероятность, с которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями возникло случайно. Например, нуклеиновая кислота считается схожей с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее приблизительно 0,2, более предпочтительно менее приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее приблизительно 0,001. Процентную идентичность между двумя аминокислотными последовательностями также можно определить с использованием алгоритма согласно E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0) при использовании таблицы веса остатков PAM120, штрафа за продолжение гэпа 12 и штрафа за открытие гэпа 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с применением алгоритма по Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступен во всемирной паутине на сайте gcg.com), с применением либо матрица Blosum 62, либо матрицы PAM250 и веса гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Помимо процентной идентичности последовательности, упомянутой выше, еще одним показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты или полипептидов являются по существу идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой,

является иммунологически перекрестно реактивным с антителами, выработка которых индуцирована полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, является по существу идентичным второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются по существу идентичными, является то, что две молекулы или их комплементарные цепи гибридизируются друг с другом в жестких условиях, как описано ниже. Еще одним показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются по существу идентичными, является то, что могут применяться те же праймеры для амплификации двух последовательностей нуклеиновой кислоты.

[332] Термин "процент комплементарности", "процент сопряженности", применяемый в данном документе в отношении двух нуклеотидных последовательностей, аналогичен понятию процента идентичности, но относится к проценту нуклеотидов запрашиваемой последовательности, которые оптимально спариваются или гибридизуются с нуклеотидами рассматриваемой последовательности, когда запрашиваемая и рассматриваемая последовательности расположены линейно и оптимально спарены без вторичных складчатых структур, таких как петли, стебли или шпильки. Такой процент комплементарности может быть между двумя нитями ДНК, двумя нитями РНК или нитью ДНК и нитью РНК. "Процент комплементарности" рассчитывают с посредством (i) оптимального спаривания или гибридизации двух нуклеотидных последовательностей в линейном и полностью вытянутом расположении (т. е. без укладки или вторичных структур) в окне сравнения, (ii) определения числа положений, которые образуют пару оснований между двумя последовательностями в окне сравнения, чтобы получить число комплементарных положений, (iii) деления числа комплементарных положений на общее число положений в окне сравнения и (iv) умножения данного коэффициента на 100% с получением процента комплементарности двух последовательностей. Оптимальное спаривание оснований двух последовательностей может быть определено на основе известных пар нуклеотидных оснований, таких как G-C, A-T и A-U, посредством водородных связей. Если "процент комплементарности" рассчитывают по отношению к эталонной последовательности без указания конкретного окна сравнения, то процент идентичности определяется делением числа комплементарных положений между двумя линейными последовательностями на общую длину эталонной последовательности. Таким образом, в целях настоящего изобретения, когда две последовательности (запрашиваемая и рассматриваемая) оптимально спарены по основаниям (с учетом несовпадений или нуклеотидов без спаривания оснований, но без укладки или вторичных структур) "процент комплементарности" для запрашиваемой последовательности равняется числу положений спаренных оснований между двумя последовательностями, деленному на общее число положений в запрашиваемой последовательности по ее длине (или на число положений в запрашиваемой последовательности в окне сравнения), которое затем умножают на 100%.

[333] Термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу не содержит других антител или других белков, характеризующихся другой антигенной специфичностью. Более того, выделенное антитело может по существу не содержать других клеточных материалов и/или химических веществ, например, антитело, выделенное из надосадочной жидкости клеток.

[334] Термин "связанный" или "связывающий" в контексте мультиспецифических связывающих молекул на основе антитела к ВТС, описанных в данном документе, относится к присоединению связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС, такой как, например, антитела к ВТС или их функциональный фрагмент, которые связывают ВТС, перечисленные в таблице 1, с молекулой. Присоединение связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС к белку может происходить, например, на амино- или карбоксиконце молекулы, например, антитела к VEGF или его функционального фрагмента. Связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС также может быть присоединена как к амино-, так и к карбоксиконцам белка. Связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС также может быть присоединена к одной или нескольким аминокислотам или нуклеиновым кислотам в пределах молекулы белка или нуклеиновой кислоты соответственно. Связывание связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС с молекулой может быть достигнуто любым способом, известным из уровня техники, включая без ограничения экспрессию связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС и молекулы в виде слитого белка или химическое соединение связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС с молекулой после трансляции либо непосредственно друг с другом, либо через линкер с помощью дисульфидных связей и т. п.

[335] Термин "линкер" или "связанный" в контексте мультиспецифической связывающей молекулы относится к присоединению одной части мультиспецифической связывающей молекулы непосредственно или опосредованно к другой части молекулы, например, связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС к связывающей функциональной единицы на основе антитела к VEGF. Линкер может быть ковалентно присоединен к одному или обоим амино- или карбоксиконцам связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС и/или белка или молекулы нуклеиновой кислоты. Пептидный линкер также может быть конъюгирован с аминокислотой или нуклеиновой кислотой в пределах последовательности белка или молекулы нуклеиновой кислоты соответственно. Предполагается, что в определенных аспектах пептидные линкеры могут быть, например, приблизительно от 2 до 25 остатков в длину.

[336] Термин "нуклеиновая кислота" используется в данном документе взаимозаменяемо с термином "полинуклеотид" и относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и полимерам на их основе в одно- либо в двух-цепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов

или модифицированные остатки или связи в остове, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, которые характеризуются свойствами связывания, подобными эталонной нуклеиновой кислоте, и которые метаболизируются подобно эталонным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают без ограничения фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидонуклеиновые кислоты (PNA). Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также потенциально охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замещения вырожденных кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. Конкретно, замещения вырожденных кодонов могут быть достигнуты созданием последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов замещено остатками смешанных оснований и/или дезоксиинозинов (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994).

[337] Термин "функционально связанный" относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более сегментами полинуклеотида (например, ДНК). Как правило, данный термин относится к функциональной взаимосвязи регулирующей транскрипцию последовательности с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность является функционально связанной с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой системе экспрессии. В целом, регулирующие транскрипцию промоторные последовательности, которые являются функционально связанными с транскрибируемой последовательностью, являются физически смежными с транскрибируемой последовательностью, т. е. они являются цис-действующими. Тем не менее, некоторые регулирующие транскрипцию последовательности, такие как энхансеры, не обязательно должны быть физически смежными или располагаться в непосредственной близости с кодирующими последовательностями, транскрипцию которых они усиливают.

[338] Применяемый в данном документе термин "оптимизированный" или "оптимизация кодона" означает, что нуклеотидная последовательность была изменена, чтобы кодировать аминокислотную последовательность с применением кодонов, которые являются предпочтительными в клетке-производителе или организме, как правило, эукариотической клетке, например, клетке *Pichia*, клетке яичника китайского хомячка (СНО), клетке человека или прокариотической клетке, например, клетке *Escherichia coli*. Оптимизация кодона относится к открытию того, что частота появления синонимичных кодонов (т. е. кодонов, которые кодируют одну и ту же аминокислоту) в кодирующей ДНК является неодинаковой у разных видов. Такое вырождение кодона обеспечивает возможность кодирования идентичного полипептида различными нуклеотидными последовательностями. Различные способы оптимизации кодона известны из уровня

техники и включают, например, способы, раскрытые в по меньшей мере в патентах США № 5786464 и № 6114148. Оптимизированную нуклеотидную последовательность конструируют таким образом, чтобы полностью или насколько это возможно сохранить аминокислотную последовательность, первоначально кодируемую исходной нуклеотидной последовательностью, которая также известна как "исходная" последовательность. Оптимизированные последовательности в контексте данного документа были сконструированы так, чтобы они имели кодоны, которые являются предпочтительными в клетках млекопитающих. Тем не менее, оптимизированная экспрессия этих последовательностей в других эукариотических клетках или прокариотических клетках также предполагается в контексте данного документа. Аминокислотные последовательности, кодируемые оптимизированными нуклеотидными последовательностями, также называются оптимизированными.

[339] Применяемый в данном документе термин "белок" относится к любым органическим соединениям, состоящим из аминокислот, расположенных в одной или нескольких линейных цепей и сложенных в трехмерную конформацию. Аминокислоты в полимерной цепи соединены вместе пептидными связями между карбоксильной и аминогруппами смежных аминокислотных остатков. Термин "белок" дополнительно включает без ограничения пептиды, одноцепочечные полипептиды или любые сложные молекулы, состоящие в основном из двух или более цепей аминокислот. Он дополнительно включает без ограничения гликопротеины или другие известные посттрансляционные модификации. Он дополнительно включает известные природные или искусственные химические модификации природных белков, таких как без ограничения гликоинжиниринг, пегилирование, гезилирование и т. п., включение неприродных аминокислот и модификация аминокислоты для химической конъюгации с другой молекулой.

[340] Термины "полипептид" и "белок" применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Фразы также применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к полимерам из встречающихся в природе аминокислот и к полимеру из не встречающихся в природе аминокислот. Если не указано иное, конкретная полипептидная последовательность также потенциально охватывает ее варианты с консервативными модификациями.

[341] Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") относится к клетке, в которую внедрили один или несколько рекомбинантных векторов экспрессии. Следует понимать, что такие термины, как предполагается, относятся не только к конкретной клетке-субъекту, но и к потомству такой клетки. Поскольку определенные модификации могут возникать в последующих поколениях либо вследствие мутации, либо вследствие влияния окружающей среды, такое потомство может фактически не быть идентичным родительской клетке, но все же включено в объем

термина "клетка-хозяин", применяемого в данном документе.

[342] Термин "субъект" включает человека и животных, отличных от человека. Животные, отличные от человека, включают всех позвоночных (например, млекопитающих и отличных от млекопитающих) таких как, приматы, отличные от человека (например, яванский макак), мыши, крысы, коты, кролики, свиньи, овцы, собаки, коровы, куры, земноводные и рептилии. За исключением случаев, когда на это обращают внимание, термины "пациент" или "субъект" используются в данном документе взаимозаменяемо. Используемые в данном документе термины "макак-крабод" или "яванский макак" относятся к яванскому макаку (*Macaca fascicularis*).

[343] "Предупреждение" или "предупредить" в отношении показаний, описанных в данном документе, таких как офтальмологические состояния или нарушения, включая состояния или нарушения, связанные с диабетическим макулярным отеком, заболеванием сосудов сетчатки, состояния или нарушения, связанные с диабетической ретинопатией, и/или состояния или нарушения, связанные с макулярным отеком, означает любое действие, которое предупреждает или замедляет ухудшение зрительной функции, анатомии сетчатки, показателя заболевания сосудов сетчатки, показателя заболевания диабетической ретинопатии и/или показателя заболевания макулярного отека, как описано ниже, у пациента, подверженного риску указанного ухудшения. Применяемые в данном документе "предупреждение" или "предупредить" в отношении состояний или нарушений, отличных от офтальмологических, включая карциному поджелудочной железы, рак молочной железы, аденокарциному эндометрия, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточную карциному головы и шеи и карциному желудка, не обязательно должно приводить к полному предупреждению состояния. Частичное предупреждение или уменьшение выраженности состояния или симптома состояния или снижение риска развития состояния также охватывается данным термином.

[344] Термин "осуществление лечения" или "лечение" состояний или нарушения, связанных с диабетическим макулярным отеком, состояний или нарушений, связанных с возрастной дегенерацией макулы, например, неоваскулярной возрастной дегенерацией макулы, состояний или нарушений, связанных с заболеванием сосудов сетчатки, состояний или нарушений, связанных с диабетической ретинопатией, и/или состояний или нарушений, связанных с макулярным отеком, означает любое действие, которое приводит к или предполагается, что оно приведет к улучшению или сохранению зрительной функции и/или анатомии сетчатки. Применяемые в данном документе "осуществление лечения" или "лечение" состояний или нарушений, отличных от офтальмологических, включая карциному поджелудочной железы, рак молочной железы, аденокарциному эндометрия, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточную карциному головы и шеи и карциному желудка, относится к любому действию, которое приводит к или предполагается, что оно приведет к улучшению или уменьшению выраженности состояний или нарушений. В другом аспекте лечение включает уменьшение частоты повторных введений и/или уменьшение числа посещений врача/больницы. Также

включают аспект, где лечение включает хроническое лечение, например, повторное введение в течение неопределенного времени. Способы оценки лечения и/или предупреждения заболевания известны из уровня техники и описаны в данном документе ниже.

[345] Термин "терапевтически приемлемое количество" или "терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" взаимозаменяемо относится к количеству, достаточному для достижения желаемого результата (т. е. снижения активности заболевания, снижения прогрессирования заболевания, уменьшения признаков и/или симптомов заболевания и т. п.). В некоторых аспектах терапевтически приемлемое количество не индуцирует или не вызывает нежелательных побочных эффектов. Терапевтически приемлемое количество может быть определено первым введением низкой дозы и затем постепенным повышением данной дозы, пока не будет достигнут желаемый эффект. "Профилактически эффективная дозировка" и "терапевтически эффективная дозировка" молекулы по настоящему изобретению могут предотвратить начало или привести к уменьшению тяжести, соответственно симптомов заболевания, включая симптомы, ассоциированные с активностью ВТС и/или активностью VEGF.

[346] Предполагается, что термин "вектор" относится к молекуле полинуклеотида, способной транспортировать другой полинуклеотид, с которым она была связана. Один тип векторов представляет собой "плазмиду", которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. В другом аспекте полинуклеотидная последовательность может быть введена субъекту с применением вирусного вектора, такого как аденоассоциированный вирусный вектор (AAV, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и AAV12), лентивирусный вектор или ретровирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут интегрироваться в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина, и благодаря этому реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе "рекомбинантными векторами экспрессии" (или просто "векторами экспрессии"). В целом, векторы экспрессии, применимые в методиках рекомбинантной ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании "плазида" и "вектор" могут применяться взаимозаменяемо, так как плазида является наиболее широко применяемой формой вектора. Тем не менее, предполагается, что настоящее изобретение включает такие другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы с дефектной репликацией, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые

выполняют эквивалентные функции.

[347] Термин "рекомбинантный" в отношении молекулы полинуклеотида (ДНК или РНК), белка, конструкции, вектора и т. п. относится к полинуклеотиду или молекуле белка или последовательности, созданной человеком и обычно не встречающейся в природе, и/или присутствует в контексте, в котором обычно не встречается в природе, включая полинуклеотидную молекулу (ДНК или РНК), белок, конструкцию и т. п., содержащей комбинацию двух или более полинуклеотидных или белковых последовательностей, которые в природе не встречаются вместе таким же образом без вмешательства человека, такие как молекула полинуклеотида, белок, конструкция и т. п., содержащие по меньшей мере две полинуклеотидные или белковые последовательности, которые функционально связаны, но гетерологичны по отношению друг к другу. Например, термин "рекомбинантный" может относиться к любой комбинации двух или более ДНК или белковых последовательностей в одной молекуле (например, плазмиде, конструкции, векторе, хромосоме, белке и т. п.), где такая комбинация создана человеком и обычно не встречается в природе. Применяемая в данном определении фраза "обычно не встречается в природе" означает не встречается в природе без введения человеком. Рекомбинантная молекула полинуклеотида или белка, конструкция и т. д., может содержать полинуклеотидную или белковую последовательность(и), которые (i) отделены от других полинуклеотидных или белковых последовательностей, которые существуют в непосредственной близости друг от друга в природе, и/или (ii) смежные с (или примыкающие к) другими полинуклеотидными или белковыми последовательностями, которые в природе не находятся в непосредственной близости друг от друга. Такая рекомбинантная молекула полинуклеотида, белок, конструкция и т. п. может также относиться к молекуле полинуклеотида или белка или последовательности, которая была генетически создана и/или сконструирована вне клетки. Например, рекомбинантная молекула ДНК может содержать любую сконструированную или созданную человеком плазмиду, вектор и т. п. и может включать линейную или кольцевую молекулу ДНК. Такие плазмиды, векторы и т. п. могут содержать различные поддерживающие элементы, включая прокариотический ориджин репликации и селективный маркер, а также один или несколько трансгенов или кассет экспрессии, возможно, в дополнение к введенному гену селективируемого маркера растения и т. п.

[348] Применяемый в данном документе термин "кодирующая область" или "область кодирования" относится к части полинуклеотида, которая кодирует функциональную единицу или молекулу (например, без ограничения мРНК, белок, или некодирующую последовательность или молекулу РНК).

[349] Применяемый в данном документе термин "терапевтический белок" относится к белку, который применяется для лечения, предупреждения или облегчения заболевания, состояния или нарушения.

[350] "Модификация" или "мутация" аминокислотного остатка/положения, применяемые в данном документе, относятся к изменению первичной аминокислотной

последовательности по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью, где изменение является результатом изменения последовательности, включающей указанный аминокислотный остаток/положение. Например, типичные модификации включают замещение остатка (или в указанном положении) другой аминокислотой (например, консервативное или неконсервативное замещение), вставку одной или нескольких аминокислот, смежных по отношению к указанным остатку/положению, и делецию указанных остатка/положения. "Аминокислотное замещение" или его вариант относится к замене существующего аминокислотного остатка в предварительно определенной (исходной) аминокислотной последовательности другим аминокислотным остатком. В общем и предпочтительно, модификация приводит к изменению по меньшей мере одной физико-биохимической активности варианта полипептида по сравнению с полипептидом, содержащим исходную аминокислотную последовательность (или "дикого типа"). Например, в случае антитела измененной физико-биохимической активностью может быть аффинность связывания, способность связывания и/или эффект связывания в отношении молекулы-мишени.

[351] Термин "консервативно модифицированный вариант" применяется как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновой кислоты. Применительно к конкретным последовательностям нуклеиновой кислоты консервативно модифицированные варианты относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или в случае, когда нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, они относятся к по существу идентичным последовательностям. Вследствие вырожденности генетического кода любой заданный белок кодируется большим числом функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, все из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин определяется кодоном, кодон может быть изменен на любой из описанных соответствующих кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновой кислоты представляют собой "молчащие вариации", которые представляют собой один вид консервативно модифицированных вариаций. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в данном документе, кодирующая полипептид, также описывает каждую возможную молчащую вариацию нуклеиновой кислоты. Специалист поймет, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, подразумевается в каждой описанной последовательности.

[352] Применяемый в данном документе термин "С-конец" относится к карбоксиконцевой аминокислоте полипептидной цепи, содержащей свободную карбоксильную группу (-COOH). Применяемый в данном документе термин "N-конец"

относится к аминоконцевой аминокислоте полипептидной цепи, содержащей свободную аминогруппу (-NH₂).

[353] Применяемые в данном документе фразы, такие как "пациент, нуждающийся в лечении" или "субъект, нуждающийся в лечении" включают субъектов, таких как млекопитающие, которым принесло бы пользу введение молекулы или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, применяемой, например, для обнаружения, для диагностической процедуры и/или для лечения.

[354] Фраза "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения на животных, и более конкретно, на людях.

[355] Термин "фармацевтическая композиция" относится к смеси по меньшей мере одного активного ингредиента (например, антитела или фрагмента по настоящему изобретению) и по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества, разбавителя или носителя.

[356] "Лекарственный препарат" относится к веществу, применяемому для медицинского лечения.

[357] "Нарушение, опосредованное ВТС" охватывает все заболевания и патологические состояния, при которых ВТС и/или VEGF непосредственно или опосредованно участвуют в заболевании или патологическом состоянии, включая этиологию, развитие, прогресс, персистенцию или патологию заболевания или состояния. Нарушение, опосредованное ВТС, может включать без ограничения карциному поджелудочной железы, рак молочной железы, аденокарциному эндометрия, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточную карциному головы и шеи, карциному желудка, диабетический макулярный отек, возрастную дегенерацию макулы, неоваскулярную возрастную дегенерацию макулы, неоваскулярную глаукому, диабетическую ретинопатию, макулярный отек, патологическую миопию, окклюзии вен сетчатки, ретинопатию недоношенных, аномальную пролиферацию сосудов, ассоциированную с факоматозами, центральную серозную хориоретинопатию и острую мультифокальную плакоидную пигментную эпителиопатию.

[358] "Нарушение, опосредованное VEGF" охватывает все заболевания и патологические состояния, при которых VEGF непосредственно или опосредованно участвует в заболевании или патологическом состоянии, включая этиологию, развитие, прогресс, персистенцию или патологию заболевания или состояния. Нарушение, опосредованное VEGF, может включать без ограничения новообразование центральной нервной системы, капиллярную гемангиобластому, менингиому, отек мозга, аденому гипофиза, неастроцитарную глиому, околоопухолевый отек, карциному молочной железы, аденокарциному, карциному легкого, диабетический макулярный отек, возрастную дегенерацию макулы, неоваскулярную возрастную дегенерацию макулы, неоваскулярную глаукому, диабетическую ретинопатию, макулярный отек, патологическую миопию,

окклюзии вен сетчатки, ретинопатию недоношенных и аномальную пролиферацию сосудов, ассоциированную с факоматозами.

Антитело к ВТС или связывающие функциональные единицы на основе антитела к ВТС

[359] ВТС является представителем семейства EGF. Он представляет собой лиганд для семейства рецепторных тирозинкиназ и главным образом активирует гомодимеры ErbB1 и ErbB4, запуская антиапоптотический и предпролиферативный сигнальные пути, такие как пути Ras/MAPK и PL3K/AKT. В глазу ВТС представляется действенным фактором проницаемости, который может играть критическую роль в развитии повышенной проницаемости сосудов сетчатки при диабетической ретинопатии и быть потенциальной терапевтической мишенью при данном заболевании. Иллюстративная аминокислотная последовательность про-ВТС человека представлена под SEQ ID NO: 156. Иллюстративная аминокислотная последовательность ВТС человека представлена под SEQ ID NO: 158. Иллюстративная аминокислотная последовательность ВТС человека, изложенная в настоящем изобретении, представлена под SEQ ID NO: 157 (остаточные аминокислотные остатки обозначены строчными буквами на N- и C-концах).

[360] Структура белка ВТС человека, связанного с четырьмя Fab-фрагментами к ВТС, недавно была определена заявителем с помощью рентгеноструктурной кристаллографии. См. пример 2. Структура ВТС человека представляет собой укладку EGF с пятью бета-цепями в трехцепочечной и двухцепочечной пластине. Структура стабилизируется тремя дисульфидными связями.

[361] В данном документе предусмотрены антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ВТС, включая ВТС человека. В некоторых аспектах предусмотренные антитело или его антигенсвязывающие фрагменты представляют собой полипептиды, которые содержат один или несколько определяющих комплементарность областей (CDR), как описано в данном документе. В некоторых аспектах CDR погружены в "каркасную" область, которая ориентирует CDR так, что достигаются надлежащие антигенсвязывающие свойства CDR. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, предусмотренные в данном документе, могут препятствовать, блокировать, уменьшать или модулировать взаимодействие между ВТС и рецептором ErbB. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, предусмотренные в данном документе, способны к подавлению активности, опосредованной ВТС (включая связывание). В некоторых аспектах антигенсвязывающие белки, связанные с такими эпитопами подавляют, помимо прочего, взаимодействия между ВТС и рецептором ErbB и другие физиологические эффекты, опосредованные ВТС. В некоторых аспектах антигенсвязывающие белки являются человеческими, такими как полностью человеческие антитела или Fab к ВТС.

[362] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающие фрагменты связываются с любым из эпитопов, связанных антителами, рассмотренными в данном документе. В некоторых аспектах это может быть определено конкурентными анализами

между антителами, раскрытыми в данном документе, и другими антителами. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающие фрагменты связываются с одним из эпитопов, связанных антителами, описанными в таблице 1. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающие фрагменты связываются с конкретным конформационным состоянием ВТС так, чтобы предотвратить взаимодействие ВТС с рецептором ErbB. В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с одним или несколькими из пяти бета-цепей ВТС человека. В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающие фрагменты связываются с бета-цепью ВТС 1 человека и предотвращают связывание ВТС с рецептором ErbB. В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающие фрагменты связываются с бета-цепью ВТС 2 человека и предотвращают связывание ВТС с рецептором ErbB. В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающие фрагменты связываются с бета-цепью ВТС 3 человека и предотвращают связывание ВТС с рецептором ErbB. В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающие фрагменты связываются с бета-цепью ВТС 4 человека и предотвращают связывание ВТС с рецептором ErbB. В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающие фрагменты связываются с бета-цепью ВТС 5 человека и предотвращают связывание ВТС с рецептором ErbB.

[363] В данном документе раскрыто антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС. В некоторых аспектах антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент предотвращают функционирование ВТС различными способами. В некоторых аспектах антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент блокируют или уменьшают способность ВТС взаимодействовать с другими веществами. Например, в некоторых аспектах антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент блокируют или уменьшают способность ВТС связываться с рецептором ErbB. В других аспектах антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент блокируют индуцированную ВТС активацию фосфо-ERK1/2. В некоторых аспектах антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент блокируют индуцированную ВТС активацию фосфо-HER3.

[364] Определенные из антител или его антигенсвязывающих фрагментов, предусмотренные в данном документе, специфически и/или селективно связываются с ВТС человека, представленным под SEQ ID NO: 157 или 158. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент селективно связываются с белком ВТС человека, как показано в примере 2 и таблице 1. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически и/или селективно связываются с по меньшей мере одним остатком из SEQ ID NO: 157, выбранным из группы, состоящей из G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, R51, R53, F54, V56, A57, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76. В некоторых аспектах более одного (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25) из идентифицированных остатков ВТС являются частью области, которая связана антителом

или его антигенсвязывающим фрагментом.

[365] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически и/или селективно связываются с R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, Q59, T60, P61 и R73 из SEQ ID NO: 157, например, NVS1. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически и/или селективно связываются с P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76 из SEQ ID NO: 157, например, NVS2. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически и/или селективно связываются с G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, R51, R53, F54 и V56 из SEQ ID NO: 157, например, NVS3. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически и/или селективно связываются с S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, A57, Q59, T60, P61, A72, R73 и E75 из SEQ ID NO: 157, например, NVS4.

[366] В аспектах, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для терапевтических применений, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут подавлять, препятствовать или модулировать одну или несколько биологических активностей ВТС. В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с ВТС человека и/или существенно подавляют связывание ВТС человека с рецептором ErbB на по меньшей мере приблизительно 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-85% или больше (например, при измерении связывания в анализе конкурентного связывания *in vitro*). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуются K_d , составляющей менее (более прочное связывание) 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} М. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуются IC_{50} для блокирования связывания рецептора ErbB с ВТС, составляющей менее 1 микроМ, от 1000 нМ до 100 нМ, от 100 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1 нМ, от 1000 пМ до 500 пМ, от 500 пМ до 200 пМ, менее 200 пМ, от 200 пМ до 150 пМ, от 200 пМ до 100 пМ, от 100 пМ до 10 пМ, от 10 пМ до 1 пМ.

[367] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с вариантами ВТС, которые составляют по меньшей мере 50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-95%, 95-99% или больше процентов идентичности с формой ВТС, представленной под SEQ ID NO: 157 или 158. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом, связанным одним из антител, описанных в таблице 1. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с конкретным конформационным состоянием ВТС так, чтобы предотвратить взаимодействие ВТС с рецептором ErbB.

[368] Антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (HCDR1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (HCDR2), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (HCDR3), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (LCDR1),

определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (LCDR2) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (LCDR3). HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержатся в варибельной области тяжелой цепи (VH). LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержатся в варибельной области легкой цепи (VL). В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR тяжелой цепи и легкой цепи (например, CDR по Kabat, Chothia, IMGT и/или объединенные CDR), как представлено в таблице 1 и описано ниже.

[369] В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 4, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Kabat. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 5, 6, 3, 17, 18 и 19 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Chothia. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно, в соответствии с объединенной схемой нумерации. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 7, 8, 9, 20, 18, и 16 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по IMGT. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой NVS1, как представлено в таблице 1. В конкретном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR тяжелой цепи и легкой цепи (например, CDR по Kabat, Chothia, IMGT и/или объединенные CDR) антитела NVS1, содержащего VH и VL, под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно.

[370] В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 28, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно в соответствии со схемой нумерации по Kabat. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 29, 30, 27, 41, 42 и 43 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Chothia. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 25, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно, в соответствии с объединенной схемой нумерации. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 31, 32, 33, 44, 42, и 40 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по IMGT. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой NVS2, как представлено в таблице 1. В конкретном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR тяжелой цепи и легкой цепи (например, CDR по Kabat, Chothia, IMGT и/или объединенные CDR) антитела NVS2, содержащего

VH и VL, под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно.

[371] В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 28, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Kabat. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 29, 51, 50, 61, 62 и 63 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Chothia. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 25, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно, в соответствии с объединенной схемой нумерации. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 31, 52, 53, 64, 62, и 60 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по IMGT. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой NVS3, как представлено в таблице 1. В конкретном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR тяжелой цепи и легкой цепи (например, CDR по Kabat, Chothia, IMGT и/или объединенные CDR) антитела NVS3, содержащего VH и VL, под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно.

[372] В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 72, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Kabat. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 73, 74, 71, 85, 18 и 86 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Chothia. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 69, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно, в соответствии с объединенной схемой нумерации. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 75, 76, 77, 87, 18, и 84 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по IMGT. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой NVS4, как представлено в таблице 1. В конкретном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR тяжелой цепи и легкой цепи (например, CDR по Kabat, Chothia, IMGT и/или объединенные CDR) антитела NVS4, содержащего VH и VL, под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

[373] Кроме того, в настоящем изобретении также предусмотрены антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотные последовательности, которые гомологичны последовательностям CDR, описанным на всем протяжении и в таблице 1, и антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с BTC и сохраняет желаемые функциональные свойства, описанных в данном

документе последовательностей. Более конкретно аминокислотные последовательности антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента могут характеризоваться большей или равной 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с последовательностями CDR, как описано на всем протяжении данного документа и представлено в таблице 1, и сохраняют их желаемые функциональные свойства.

[374] В настоящем изобретении также предусмотрены антитела к ВТС или их антигенсвязывающие фрагменты, которые гомологичны последовательностям VH и VL, описанным в данном документе. Более конкретно в настоящем изобретении предусмотрен белок, содержащий аминокислотные последовательности, которые гомологичны таким последовательностям как те, что описаны в таблице 1, и при этом антитела к ВТС или антигенсвязывающие фрагменты связываются с терапевтической мишенью, например, офтальмологической мишенью, и сохраняют желаемые функциональные свойства тех, что описаны в таблице 1 и примерах. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие области VH и VL с менее чем 100% идентичностью последовательности с областями VH и VL, описанными в таблице 1, могут быть получены с помощью мутагенеза (например, сайт-направленного или опосредованного PCR мутагенеза) молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в таблице 1, с последующим испытанием кодируемого измененного антитела на сохранение функции с применением функциональных анализов, описанных в данном документе и в US 20120014958. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь с высокой (т. е. 80% или больше) идентичностью с тяжелыми цепями и легкими цепями, описанными в таблице 1, могут быть получены с помощью мутагенеза (например, сайт-направленного или опосредованного PCR мутагенеза) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей такие полипептиды, с последующим испытанием кодируемого измененного антитела на сохранение функции, например, с применением функциональных анализов, описанных в данном документе.

[375] Антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью

последовательности с SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно. Предполагается, что вариабельность может быть в области CDR или каркасной области. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно. В другом аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой NVS1, как представлено в таблице 1. В другом аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 11 и 22 соответственно. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно. В другом аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[376] В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно. Предполагается, что вариабельность может быть в области CDR или каркасной области. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно. В другом аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой NVS2, как представлено в таблице 1. В другом аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 35 и 46 соответственно. В одном аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно. В другом аспекте различия в аминокислотной

последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[377] В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно. Предполагается, что вариабельность может быть в области CDR или каркасной области. В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно. В другом аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой NVS3, как представлено в таблице 1. В другом аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 55 и 66 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно. В другом аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[378] В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно. Предполагается, что вариабельность может быть в области CDR или каркасной области. В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно. В другом аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой NVS4, как представлено в таблице 1. В другом аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 79 и 89 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно. В другом аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[379] Антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 12 и 23 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12 и 23 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС может подавлять активность ВТС, например, связывание ВТС с 1) ErbB1; 2) ErbB4; 3) гомодимером ErbB (например, ErbB1/ErbB1 и ErbB4/ErbB4); 4) гетеродимером ErbB (например, ErbB1/ErbB2, ErbB1/ErbB3, ErbB1/ErbB4, ErbB2/ErbB3 и ErbB2/ErbB4) и/или 5) может ингибировать фосфорилирование ERK1/2. В другом аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой NVS1, как представлено в таблице 1. В другом аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%,

по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 13 и 24 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 13 и 24 соответственно, и представляют собой NVS1, как представлено в таблице 1.

[380] В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 36 и 47 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 36 и 47 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС может подавлять активность ВТС, например, связывание ВТС с 1) ErbB1; 2) ErbB4; 3) гомодимером ErbB (например, ErbB1/ErbB1 и ErbB4/ErbB4); 4) гетеродимером ErbB (например, ErbB1/ErbB2, ErbB1/ErbB3, ErbB1/ErbB4, ErbB2/ErbB3 и ErbB2/ErbB4) и/или 5) может ингибировать фосфорилирование ERK1/2. В другом аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой NVS2, как представлено в таблице 1. В другом аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 50%, по

меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 37 и 48 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 37 и 48 соответственно, и представляют собой NVS2, как представлено в таблице 1.

[381] В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 56 и 67 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 56 и 67 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС может подавлять активность ВТС, например, связывание ВТС с 1) ErbB1; 2) ErbB4; 3) гомодимером ErbB (например, ErbB1/ErbB1 и ErbB4/ErbB4); 4) гетеродимером ErbB (например, ErbB1/ErbB2, ErbB1/ErbB3, ErbB1/ErbB4, ErbB2/ErbB3 и ErbB2/ErbB4) и/или 5) может ингибировать фосфорилирование ERK1/2. В другом аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой NVS3, как

представлено в таблице 1. В другом аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 57 и 68 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 57 и 68 соответственно, и представляют собой NVS3, как представлено в таблице 1.

[382] В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 80 и 90 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 80 и 90 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС может подавлять активность ВТС, например, связывание ВТС с 1) ErbB1; 2) ErbB4; 3) гомодимером ErbB (например, ErbB1/ErbB1 и ErbB4/ErbB4); 4) гетеродимером ErbB (например, ErbB1/ErbB2, ErbB1/ErbB3, ErbB1/ErbB4, ErbB2/ErbB3 и

ErB2/ErB4) и/или 5) может ингибировать фосфорилирование ERK1/2. В другом аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой NVS4, как представлено в таблице 1. В другом аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 81 и 91 соответственно. В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 81 и 91 соответственно, и представляют собой NVS4, как представлено в таблице 1.

[383] Дополнительно включены в пределах объема настоящего изобретения выделенное антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент с консервативными модификациями. Более конкретно настоящее изобретение относится к связывающим функциональным единицам на основе антитела к ВТС и молекулам, конъюгированным с ее связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС с консервативной модификацией связывающих функциональных единиц на основе антитела к ВТС, и молекулам, конъюгированным со связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС, из таблицы 1. В определенных аспектах антитело, конъюгированное со связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС, по настоящему изобретению имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где один или несколько таких последовательностей CDR имеют указанные аминокислотные последовательности на основе антител, описанных в данном документе, или их консервативные модификации, и где антитело сохраняет желаемые функциональные свойства антител по настоящему изобретению.

[384] В конкретном аспекте в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, последовательности которых кодируют антитело к ВТС, описанное в данном документе

(например, в таблице 1), или его фрагменты (например, VH или VL). В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент кодируются полинуклеотидом, последовательность которого была подвергнута оптимизации кодонов для экспрессии в клетках млекопитающих. В другом аспекте вся конструкция антитела к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент кодируются полинуклеотидом, вся последовательность которого была подвергнута оптимизации кодонов для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека. В других аспектах антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих и имеют полноразмерную последовательность тяжелой цепи и полноразмерную последовательность легкой цепи, где одна или несколько из таких последовательностей имеют указанные аминокислотные последовательности на основе антител, описанных в данном документе, или их консервативных модификаций, и где связывающие функциональные единицы на основе антитела к ВТС сохраняют желаемые функциональные свойства антител, связывающих ВТС, по настоящему изобретению. Соответственно в настоящем изобретении предусмотрены выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, оптимизированные для экспрессии в клетках млекопитающих, содержащие, например, VH и VL, где VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, 34, 54 и 78, и ее консервативные модификации, и VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21, 45, 65 и 88, и ее консервативные модификации, которые специфически связываются с ВТС.

[385] В настоящем изобретении предусмотрены связывающие функциональные единицы на основе антитела к ВТС (например, антитела, связывающие ВТС, или их фрагменты), которые связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, что и антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в таблице 1. Дополнительные антитела могут следовательно быть идентифицированы на основе их способности конкурировать (например, конкурентно подавлять связывание статистически значимым способом) с другими антителами по настоящему изобретению в анализах связывания ВТС. Способность исследуемого антитела подавлять связывание молекул по настоящему изобретению с ВТС демонстрирует, что исследуемая молекула может конкурировать с тем антителом за связывание с ВТС; такое антитело может в соответствии с неограничивающей теорией связываться с тем же или родственным (например, структурно подобным или пространственно близким) эпитопом на ВТС, что и антитело, с которым оно конкурирует. В определенном аспекте молекула, которая связывается с тем же эпитопом на ВТС, что и антитело по настоящему изобретению, представляет собой человеческое моноклональное антитело, Fab или scFv. Такие человеческие моноклональные антитела, Fab и scFv могут быть получены и выделены, как описано в данном документе.

[386] В одном аспекте молекула, которая конкурирует с антителом к ВТС или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению, связывается с по меньшей мере одним остатком из SEQ ID NO: 157, выбранным из группы, состоящей из

G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, R51, R53, F54, V56, A57, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны к конкуренции с описанными в таблице 1, например, NVS1, NVS2, NVS3 и NVS4, для связывания с ВТС и снижения опосредованной ВТС передачи сигнала. В другом аспекте конкурирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, представленные под SEQ ID NO: 168-189 в таблице 5.

[387] Антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению находятся в формате, выбранном из группы, состоящей из выделенного антитела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и scFv. В предпочтительном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой Fab, включая Fab содержащую Fc-область. В другом аспекте Fc-область выбрана из группы, состоящей из Fc-области IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE и IgD. В одном аспекте Fc-область содержит последовательность константной области каппа-цепи иммуноглобулина человека, представленную под SEQ ID NO: 159. В другом аспекте Fc-область содержит первый константный домен Ig тяжелой цепи (домен CH1) иммуноглобулина человека, представленный под SEQ ID NO: 160.

[388] В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой выделенное антитело, например, человеческое моноклональное антитело или моноклональное гуманизированное антитело. В определенных аспектах антитела к ВТС могут находиться в формате scFv или Fab. В определенных аспектах антитела к ВТС могут находиться в формате scFv или Fab.

Таблица 1. Иллюстративные Fab к ВТС

NVS1		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GGTFSSY AIS
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	GIVPWMGEAVYAQKFQG
SEQ ID NO: 3 (комбинированная)	HCDR3	SSSTYGIHAFDY
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	SYAIS
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	GIVPWMGEAVYAQKFQG
SEQ ID NO: 3 (Kabat)	HCDR3	SSSTYGIHAFDY
SEQ ID NO: 5	HCDR1	GGTFSSY

(Chothia)		
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	VPWMGE
SEQ ID NO: 3 (Chothia)	HCDR3	SSSTYGIHAFDY
SEQ ID NO: 7 (IMGT)	HCDR1	GGTFSSYA
SEQ ID NO: 8 (IMGT)	HCDR2	IVPWMGEA
SEQ ID NO: 9 (IMGT)	HCDR3	ARSSSTYGIHAFDY
SEQ ID NO: 10	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIVPWMGEAVY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARSSSTYGIHAFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 11	ДНК, кодирующая VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAA GTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTT AGCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTAGC AGCTATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCC CCGGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGT ATCGTTCCGTGGATGGGCGAAGCTGTTTAC GCCCAGAAATTCAGGGCCGGGTGACCATT ACCGCCGATGAAAGCACCAGCACC GCCTAT ATGGA ACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTTCTTCTT CTACTTACGGTATCCATGCTTTCGATTACTG GGGCCAAGGCACCCTGGT GACTGTTAGCTC A
SEQ ID NO: 12	Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIVPWMGEAVY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARSSSTYGIHAFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS

		SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRV EPKSC
SEQ ID NO: 13	ДНК, кодирующая тяжелую цепь	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAA GTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTT AGCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTAGC AGCTATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCC CCGGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGT ATCGTTCCGTGGATGGGCGAAGCTGTTTAC GCCCAGAAATTCAGGGCCGGGTGACCATT ACCGCCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTAT ATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTTCTTCTT CTACTTACGGTATCCATGCTTTCGATTACTG GGGCCAAGGCACCCTGGTGAAGTGTAGCTC AGCCTCCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTC CCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTGTC CTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAG CGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGAC CTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGC CCAAGAGCTGT
SEQ ID NO: 14 (комбинированная)	LCDR1	RASQISISNFLN
SEQ ID NO: 15 (комбинированная)	LCDR2	AASNLQS
SEQ ID NO: 16 (комбинированная)	LCDR3	QQYDDFPMT
SEQ ID NO: 14 (Kabat)	LCDR1	RASQISISNFLN
SEQ ID NO: 15 (Kabat)	LCDR2	AASNLQS

SEQ ID NO: 16 (Kabat)	LCDR3	QQYDDFPMT
SEQ ID NO: 17 (Chothia)	LCDR1	SQISISNF
SEQ ID NO: 18 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 19 (Chothia)	LCDR3	YDDFPM
SEQ ID NO: 20 (IMGT)	LCDR1	QISISNF
SEQ ID NO: 18 (IMGT)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 16 (IMGT)	LCDR3	QQYDDFPMT
SEQ ID NO: 21	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISISNFL NWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQGVPSRFSG SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYDDFPM TFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 22	ДНК, кодирующая VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGC CTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACC ATTACCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTA ACTTCCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCGG GCAAAGCGCCGAACTATTAATCTACGCTG CTTCTAACCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCC GCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATT TCACCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCGGA AGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTAC GACGACTTCCCGATGACCTTTGGCCAGGGC ACGAAAGTTGAAATTA
SEQ ID NO: 23	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISISNFL NWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQGVPSRFSG SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYDDFPM TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNFPYAPKRVQWVVDNALQSGNS

		QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 24	ДНК, кодирующая легкую цепь	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGC CTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACC ATTACCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTA ACTTCCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCGG GCAAAGCGCCGAACTATTAATCTACGCTG CTTCTAACCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCC GCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATT TCACCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCGGA AGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTAC GACGACTTCCCGATGACCTTTGGCCAGGGC ACGAAAGTTGAAATTAACGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGC GTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCC GGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGAC AACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGA AAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCT GAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGG TGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCC TGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACC GGGGCGAGTGT
NVS2		
SEQ ID NO: 25 (комбинированная)	HCDR1	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 26 (комбинированная)	HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 27 (комбинированная)	HCDR3	QRYYFGEFDL
SEQ ID NO: 28 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 26	HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG

(Kabat)		
SEQ ID NO: 27 (Kabat)	HCDR3	QRYYFGEFDL
SEQ ID NO: 29 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 30 (Chothia)	HCDR2	SGSGGS
SEQ ID NO: 27 (Chothia)	HCDR3	QRYYFGEFDL
SEQ ID NO: 31 (IMGT)	HCDR1	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 32 (IMGT)	HCDR2	ISGSGGST
SEQ ID NO: 33 (IMGT)	HCDR3	ARQRYYFGEFDL
SEQ ID NO: 34	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARQRYYFGEFDLWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 35	ДНК, кодирующая VH	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGTGGCGGT CTGGTGCAGCCAGGTGGTAGCCTGCGCCTG AGCTGTGCCGCAAGCGGCTTTACCTTTAGC AGCTATGCCATGAGCTGGGTGCGCCAAGCA CCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCGCC ATTAGCGGCAGCGGTGGCAGCACCTATTAT GCCGATAGCGTGAAAGGTCGCTTTACCATT AGTCGCGATAACAGCAAAAACACCCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGCGGGCAGAAGAT ACCGCAGTTTATTATTGCGCGCGACAACGTT ACTACTTCGGTGAGTTCGACCTGTGGGGCC AGGGCACCCCTGGTTACTGTCTCGAGC
SEQ ID NO: 36	Тяжелая цепь	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV

		YYCARQRYFGEFDLWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SC
SEQ ID NO: 37	ДНК, кодирующая тяжелую цепь	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGTGGCGGT CTGGTGCAGCCAGGTGGTAGCCTGCGCCTG AGCTGTGCCGCAAGCGGCTTTACCTTTAGC AGCTATGCCATGAGCTGGGTGCGCCAAGCA CCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCGCC ATTAGCGGCAGCGGTGGCAGCACCTATTAT GCCGATAGCGTGAAAGGTCGCTTTACCATT AGTCGCGATAACAGCAAAAACACCCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGCGGGCAGAAGAT ACCGCAGTTTATTATTGCGCGCGACAACGTT ACTACTTCGGTGAGTTCGACCTGTGGGGCC AGGGCACCCCTGGTTACTGTCTCGAGCGCCA GCACAAAGGGACCCAGCGTGTTCCTCTGG CCCCCAGCAGCAAGTCTACATCTGGCGGAA CAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACT ACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTCTGGA ACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGACA CCTTTCCAGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGCC TGTA CTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGC CCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACA TCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACA CAAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAACCCAAG TCCTGC
SEQ ID NO: 38 (комбинированная)	LCDR1	SGDKLGDKYAY
SEQ ID NO: 39 (комбинированная)	LCDR2	QDSKRPS
SEQ ID NO: 40 (комбинированная)	LCDR3	QAFDYLYSLGV
SEQ ID NO: 38	LCDR1	SGDKLGDKYAY

(Kabat)		
SEQ ID NO: 39 (Kabat)	LCDR2	QDSKRPS
SEQ ID NO: 40 (Kabat)	LCDR3	QAFDYLYSLGV
SEQ ID NO: 41 (Chothia)	LCDR1	DKLGDKY
SEQ ID NO: 42 (Chothia)	LCDR2	QDS
SEQ ID NO: 43 (Chothia)	LCDR3	FDYLYSLG
SEQ ID NO: 44 (IMGT)	LCDR1	KLGDY
SEQ ID NO: 42 (IMGT)	LCDR2	QDS
SEQ ID NO: 40 (IMGT)	LCDR3	QAFDYLYSLGV
SEQ ID NO: 45	VL	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYA YWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQAFDYLYS LGVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 46	ДНК, кодирующая VL	AGCTATGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTT AGCGTTAGCCCAGGCCAGACCGCCAGCATT ACCTGTAGCGGCGACAACTGGGCGACAAA TACGCCTACTGGTATCAGCAGAAACCGGGC CAGAGCCCGGTGCTGGTTATCTATCAGGAT AGCAAACGCCCAGCGGCATTCCAGAACGC TTAGCGGCAGCAACAGCGGCAACACCGCC ACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCCGAA GACGAAGCCGATTATTACTGTCAGGCTTTC GACTACCTGTATTCCCTGGGTGTGTTTGGCG GCGGTACCAAGCTGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 47	Легкая цепь	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYA YWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGS

		NSGNTATLTISGTQAEDEADYQCQAFDYLYS LGVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 48	ДНК, кодирующая легкую цепь	AGCTATGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTT AGCGTTAGCCCAGGCCAGACCGCCAGCATT ACCTGTAGCGGCGACAACTGGGCGACAAA TACGCCTACTGGTATCAGCAGAAACCGGGC CAGAGCCCGGTGCTGGTTATCTATCAGGAT AGCAAACGCCCGAGCGGCATTCCAGAACGC TTAGCGGCAGCAACAGCGGCAACACCGCC ACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCCGAA GACGAAGCCGATTATTACTIONGTCAGGCTTTC GACTACCTGTATTCCCTGGGTGTGTTTGGCG GCGGTACCAAGCTGACCGTGCTGGGCCAGC CCAAAGCCGCCCTAGCGTGACCCTGTTCC CCCCAAGCAGCGAGGAACTCCAGGCCAACA AGGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACT TCTACCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGA AGGCCGATAGCAGCCCTGTGAAGGCCGGCG TGGAACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCA ACAACAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGA GCCTGACCCCGAGCAGTGGAAGTCCCACA GATCCTACAGCTGCCAGGTCACACACGAGG GCAGCACCGTGGAAGACCGTGGCCCCCA CCGAGTGCAGC
NVS3		
SEQ ID NO: 25 (комбинированная)	HCDR1	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 49 (комбинированная)	HCDR2	GLGHVGYTTYTDSVKG
SEQ ID NO: 50 (комбинированная)	HCDR3	DYLDGFGYYFDV
SEQ ID NO: 28	HCDR1	SYAMS

(Kabat)		
SEQ ID NO: 49 (Kabat)	HCDR2	GLGHVGYTTYTDSVKG
SEQ ID NO: 50 (Kabat)	HCDR3	DYLDFGYFFDV
SEQ ID NO: 29 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 51 (Chothia)	HCDR2	GHVGY
SEQ ID NO: 50 (Chothia)	HCDR3	DYLDFGYFFDV
SEQ ID NO: 31 (IMGT)	HCDR1	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 52 (IMGT)	HCDR2	LGHVGYT
SEQ ID NO: 53 (IMGT)	HCDR3	ARDYLDFGYFFDV
SEQ ID NO: 54	VH	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSGLGHVGYTTYTDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDYLDFGYFFDVWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 55	ДНК, кодирующая VH	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGA CTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTA GCTACGCTATGAGCTGGGTCCGGCAGGCCC CTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTCTCCGGAC TGGGTACAGTGGGCTACACTACCTACACCG ATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCTATCTCTA GGGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACCG CCGTCTACTACTGCGCTAGAGACTACCTGG ACTTCGGCTACTACTTCGACGTGTGGGGCC AGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 56	Тяжелая цепь	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY

		AMSWVRQAPGKGLEWVSGLGHVGYTTYTDS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDYLDFGYFDVWGGQTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSC
SEQ ID NO: 57	ДНК, кодирующая тяжелую цепь	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGA CTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTA GCTACGCTATGAGCTGGGTCCGGCAGGCC CTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTCTCCGGAC TGGGTCACGTGGGCTACACTACCTACACCG ATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCTA GGGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACCG CCGTCTACTACTGCGCTAGAGACTACCTGG ACTTCGGCTACTACTTCGACGTGTGGGGCC AGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTA GCACTAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGC CCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGCACC GCTGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC TTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGA ACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTT CCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTAC TCCCTGTCTCCGTGGTGCAGTGCCTTCCCT CCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGG TGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCATGC
SEQ ID NO: 58 (комбинированная)	LCDR1	SGDKIGKKYVH
SEQ ID NO: 59 (комбинированная)	LCDR2	DDSDRPS
SEQ ID NO: 60 (комбинированная)	LCDR3	QAWDMQSVV

SEQ ID NO: 58 (Kabat)	LCDR1	SGDKIGKKYVH
SEQ ID NO: 59 (Kabat)	LCDR2	DDSDRPS
SEQ ID NO: 60 (Kabat)	LCDR3	QAWDMQSVV
SEQ ID NO: 61 (Chothia)	LCDR1	DKIGKKY
SEQ ID NO: 62 (Chothia)	LCDR2	DDS
SEQ ID NO: 63 (Chothia)	LCDR3	WDMQSV
SEQ ID NO: 64 (IMGT)	LCDR1	KIGKKY
SEQ ID NO: 62 (IMGT)	LCDR2	DDS
SEQ ID NO: 60 (IMGT)	LCDR3	QAWDMQSVV
SEQ ID NO: 65	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDKIGKKYV HWYQQKPGQAPVLVIYDDSDRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQAWDMQS VVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 66	ДНК, кодирующая VL	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTGAGCGTC AGCGTGGCCCTGGGCCAGACCGCTAGAATC ACCTGTAGCGGCGATAAGATCGGCAAGAAA TACGTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGC CAGGCCCCCGTGCTGGTCATCTACGACGAT AGCGATAGACCTAGCGGAATCCCCGAGCGG TTAGCGGCTCTAATAGCGGCAACACCGCT ACCCTGACTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGC GACGAGGCCGACTACTACTGTCAGGCCTGG GATATGCAGTCAGTGGTGTTCGGCGGAGGC ACTAAGCTGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 67	Легкая цепь	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDKIGKKYV

		HWYQQKPGQAPVLYYDDSDRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQAWDMQS VVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 68	ДНК, кодирующая легкую цепь	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTGAGCGTC AGCGTGCCCTGGGCCAGACCGCTAGAATC ACCTGTAGCGGCGATAAGATCGGCAAGAAA TACGTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGC CAGGCCCCCGTGCTGGTCATCTACGACGAT AGCGATAGACCTAGCGGAATCCCCGAGCGG TTAGCGGCTCTAATAGCGGCAACACCGCT ACCCTGACTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGC GACGAGGCCGACTACTACTGTCAGGCCTGG GATATGCAGTCAGTGGTGTTCGGCGGAGGC ACTAAGCTGACCGTGCTGGGCCAGCCTAAG GCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCA GCAGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCC ACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACC CAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCG ACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGAGGA CCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACA AGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGA CCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCT ACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCA CCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCAACCGAGT GCAGC
NVS4		
SEQ ID NO: 69 (комбинированная)	HCDR1	GFTFSRYWIS
SEQ ID NO: 70 (комбинированная)	HCDR2	YIDSTGTFINYADSVKG
SEQ ID NO: 71 (комбинированная)	HCDR3	GGSLFDY

SEQ ID NO: 72 (Kabat)	HCDR1	RYWIS
SEQ ID NO: 70 (Kabat)	HCDR2	YIDSTGTFINYADSVKG
SEQ ID NO: 71 (Kabat)	HCDR3	GGSLFDY
SEQ ID NO: 73 (Chothia)	HCDR1	GFTFSRY
SEQ ID NO: 74 (Chothia)	HCDR2	DSTGTF
SEQ ID NO: 71 (Chothia)	HCDR3	GGSLFDY
SEQ ID NO: 75 (IMGT)	HCDR1	GFTFSRYW
SEQ ID NO: 76 (IMGT)	HCDR2	IDSTGTFI
SEQ ID NO: 77 (IMGT)	HCDR3	ARGGSLFDY
SEQ ID NO: 78	VH	QVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY WISWVRQAPGKGLEWVSYIDSTGTFINYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGGSLFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 79	ДНК, кодирующая VH	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGA CTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTA GGTACTGGATTAGCTGGGTCCGGCAGGCCC CTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTCTCCTATA TCGACTCTACCGGCACCTTTATTAACACTACGC CGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCTATCTC TAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCT GCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGGCGGTAG TCTGTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTCACCGTGTCTAGC

SEQ ID NO: 80	Тяжелая цепь	<p>QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY WISWVRQAPGKGLEWVSYIDSTGTFINYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGGSLFDYWQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSC</p>
SEQ ID NO: 81	ДНК, кодирующая тяжелую цепь	<p>CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGA CTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTA GGTACTGGATTAGCTGGGTCCGGCAGGCC CTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTCTCCTATA TCGACTCTACCGGCACCTTTATTAACACGC CGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACATATCTC TAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCT GCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGGCGGTAG TCTGTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGG CCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGC AAGTCTACCTCTGGCGGCACCGCTGCTCTG GGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAG CCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCG TGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTAATCCCTGTC CTCCGTGGTGACAGTGCCTTCCCTCCAGCCTG GGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAAC CACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAG CGGGTGGAGCCTAAGTCATGC</p>
SEQ ID NO: 82 (комбинированная)	LCDR1	RASQGIISYLG
SEQ ID NO: 83 (комбинированная)	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 84 (комбинированная)	LCDR3	QQYDALNT

SEQ ID NO: 82 (Kabat)	LCDR1	RASQGIISYLG
SEQ ID NO: 83 (Kabat)	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 84 (Kabat)	LCDR3	QQYDALNT
SEQ ID NO: 85 (Chothia)	LCDR1	SQGIISY
SEQ ID NO: 18 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 86 (Chothia)	LCDR3	YDALN
SEQ ID NO: 87 (IMGT)	LCDR1	QGIISY
SEQ ID NO: 18 (IMGT)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 84 (IMGT)	LCDR3	QQYDALNT
SEQ ID NO: 88	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISYL GWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFLTLISSLPEDFATYYCQQYDALNTF GQGTKVEIK
SEQ ID NO: 89	ДНК, кодирующая VL	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGC CTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACT ATCACCTGTAGAGCCTCTCAGGGGATTATT AGCTACCTGGGCTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCC GCCTCTAGCCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTA GGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACT TCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT ACGACGCCCTGAACACCTTCGGCCAGGGCA CTAAGGTCGAGATTAAG
SEQ ID NO: 90	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISYL

		<p>GWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYDALNTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
SEQ ID NO: 91	ДНК, кодирующая легкую цепь	<p>GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGC CTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTACT ATCACCTGTAGAGCCTCTCAGGGGATTATT AGCTACCTGGGCTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCC GCCTCTAGCCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTA GGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACT TCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT ACGACGCCCTGAACACCTTCGGCCAGGGCA CTAAGGTTCGAGATTAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT GGTGTGCCTGCTGAACAАCTTCTACCCCCG GGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACA ACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAG AGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTG AGCAAGGCCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAG GGGCGAGTGC</p>

Связывающий партнер антитела к ВТС

[389] Как было сказано выше в настоящее изобретение включены композиции, включающие одно или несколько антител к ВТС или их антигенсвязывающих фрагментов, конъюгированных (например, ковалентно связанных, не ковалентно связанных или слитых) с функциональной единицей, связывающей терапевтическую мишень, специфической в отношении мишени, находящейся в или рядом с тканью, содержащей ВТС (например, значительные уровни ВТС, например, глаз, поджелудочная железа и т. п.). Например, в настоящее изобретение включены композиции с одним или

несколькими антителами к ВТС или их антигенсвязывающими фрагментами, присоединенные к функциональной единице, связывающей терапевтическую мишень, подходящую для лечения ассоциированных с ВТС состояний или заболеваний (например, DR, DME, AMD, например, неоваскулярной AMD и/или RVO). В другом аспекте в настоящее изобретение включена фармацевтическая композиция, содержащая антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент и функциональную единицу, связывающую терапевтическую мишень, и фармацевтическая композиция может применяться в лечении опосредованных ВТС состояний или заболеваний. В еще другом аспекте в настоящее изобретение включен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению с последующим введением субъекту функциональной единицы, связывающей терапевтическую мишень (например, ингибитора VEGF), где субъект имеет опосредованные ВТС состояния или заболевания.

[390] В определенных предпочтительных аспектах функциональная единица, связывающая терапевтическую мишень, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают терапевтическую мишень (например, в формате scFv, Fab, однодоменного антитела или диатела), или полипептид, который связывает терапевтическую мишень (например, растворимый рецептор). Такие терапевтические мишени могут быть, например, ассоциированы с офтальмологическим нарушением, например, VEGF, PDGF, PDGF-BB, ангиопоэтином, ангиопоэтином-2, S1P, интегринами $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha5\beta1$, апелином/APJ, эритропоэтином, фактором комплемента D, TNF α , C2, фактором В, фактором Н, фактором Р, CFHR3, C1q, C3, C3b, C5, C5a, C3a, HtrA1, ARMS2, EPO, EPOR, TIMP3, HLA, IL8, CX3CR1, TLR3, TLR4, CETP, LIPC, COL10A1, IL-1 β , IL-17A, FGFR2 и TNFRSF10A. Дополнительные терапевтические мишени включают фактор Р, фактор D, IL-6, IL-12, IL-18, bFGF, MCP-1, CD132, IL-6R, CD20 и IGF-1.

[391] В одном аспекте в настоящее изобретение включены мультиспецифические связывающие молекулы, содержащие по меньшей мере одну из связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС и одну или несколько функциональных единиц, связывающих терапевтическую мишень. Соответственно, в одном аспекте в настоящее изобретение включены, например, биспецифические молекулы (например, биспецифические антитела), характеризующиеся комбинациями селективностей связывания, выбранных из следующих: ВТС и VEGF, ВТС и PDGF, ВТС и PDGF-BB, ВТС и ангиопоэтин, ВТС и ангиопоэтин-2, ВТС и S1P, ВТС и интегрин $\alpha\beta3$, ВТС и $\alpha\beta5$, ВТС и $\alpha5\beta1$, ВТС и апелин/APJ, ВТС и эритропоэтин, ВТС и фактор комплемента D, ВТС и TNF α , ВТС и C2, ВТС и фактор В, ВТС и фактор Н, ВТС и CFHR3, ВТС и C1q, ВТС и C3, ВТС и C3b, ВТС и C5, ВТС и C5a, ВТС и C3a, ВТС и HtrA1, ВТС и ARMS2, ВТС и EPO, ВТС и EPOR, ВТС и TIMP3, ВТС и HLA, ВТС и IL8, ВТС и CX3CR1, ВТС и TLR3, ВТС и TLR4, ВТС и CETP, ВТС и LIPC, ВТС и COL10A1, ВТС и IL-1 β , ВТС и IL-17A, ВТС и FGFR2, ВТС и TNFRSF10A, ВТС и фактор Р, ВТС и фактор

D, ВТС и IL-6, ВТС и IL-12, ВТС и IL-18, ВТС и bFG, ВТС и MCP-1, ВТС и CD132, ВТС и IL-6R, ВТС и CD20 или ВТС и IGF-1.

[392] В одном аспекте функциональная единица, связывающая терапевтическую мишень, может представлять собой антагонист на основе антитела к VEGF. В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой ранибизумаб (Lucentis®; WO 98/45331; WO 98/45331; US 6884879; US 6407213; US 7060269; US 7365166). В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой бевацизумаб (Avastin®; US 6054297; US 7169901; US 7375193; US 7297334). В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой афлиберцепт (Eylea®; US 7279159). В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой бролуцизумаб (Beovu®; WO 2009/155724; US 8349322; US 9090684; US 9873737; WO 03/097697; WO 2016/073915; WO/2016/073918). В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой пэгаптаниб (Macugen®). В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой КН902 (WO 2005/121176; US 7750138). В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF содержит тяжелую цепь и легкую цепь, представленные под SEQ ID NO: 103 и 114 соответственно. В одном аспекте антагонист на основе антитела к VEGF кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 104 и 115.

Мультиспецифическая связывающая молекула

[393] В настоящем изобретении также предусмотрена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая 1) связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и 2) связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF.

Связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС

[394] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС связывается с ВТС человека, представленным под SEQ ID NO: 157 или 158. В некоторых аспектах связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС селективно связывается с белком ВТС человека, как проиллюстрировано в примере 2 и таблице 4. В некоторых аспектах связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС специфически и/или селективно связывается с по меньшей мере одним остатком из SEQ ID NO: 157, выбранным из группы, состоящей из G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, R51, R53, F54, V56, A57, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76. В некоторых аспектах более одного (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25) из идентифицированных остатков ВТС являются частью области, которая связана связывающей функциональной единицей на основе антитела к ВТС. В конкретных аспектах такая связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС селективно связывается с белком ВТС человека и подавляет активность ВТС (например, частично подавляет).

[395] В некоторых аспектах связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС специфически и/или селективно связывается с R38, C39, P40, K41, Q42,

Y43, H45, Y46, F54, Q59, T60, P61, и R73 из SEQ ID NO: 157, например, NVS11. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически и/или селективно связываются с P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76 из SEQ ID NO: 157, например, NVS12. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически и/или селективно связываются с G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, R51, R53, F54 и V56 из SEQ ID NO: 157, например, NVS13. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически и/или селективно связываются с S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, A57, Q59, T60, P61, A72, R73 и E75 из SEQ ID NO: 157, например, NVS14. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС представляет собой антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано на всем протяжении данного документа. В конкретных аспектах такая связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС селективно связывается с белком ВТС человека и подавляет активность ВТС (например, частично подавляет).

[396] В аспектах, где связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС применяют для терапевтических применений, связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС может подавлять, препятствовать или модулировать одну или несколько биологических активностей ВТС. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС специфически связывается с ВТС человека и/или значительно подавляет связывание ВТС человека с рецептором ErbB на по меньшей мере, приблизительно 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-85% или больше (например, при измерении связывания в анализе конкурентного связывания *in vitro*). В некоторых аспектах вышеуказанная связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС характеризуется K_d , составляющей менее (более прочное связывание) 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} М. В некоторых аспектах связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС характеризуется IC_{50} для блокирования связывания рецептора ErbB с ВТС, составляющей менее 1 микроМ, от 1000 нМ до 100 нМ, от 100 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1 нМ, от 1000 пМ до 500 пМ, от 500 пМ до 200 пМ, менее 200 пМ, от 200 пМ до 150 пМ, от 200 пМ до 100 пМ, от 100 пМ до 10 пМ, от 10 пМ до 1 пМ. В конкретных аспектах такая связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС селективно связывается с белком ВТС человека и подавляет активность ВТС (например, частично подавляет).

[397] В некоторых аспектах связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС связывается с вариантами ВТС, которые приблизительно на по меньшей мере 50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-95%, 95-99% или больше процентов идентичны форме ВТС, представленной под SEQ ID NO: 157 или 158. В некоторых аспектах связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС связывается с эпитопом, связанным одним из антител, описанных в таблице 3. В некоторых аспектах связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС связывается с конкретным конформационным состоянием ВТС так, чтобы предотвратить

взаимодействие ВТС с рецептором ErbB.

[398] Связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (HCDR1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (HCDR2), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (HCDR3), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (LCDR1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (LCDR2) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (LCDR3). HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержатся в варибельной области тяжелой цепи (VH). LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержатся в варибельной области легкой цепи (VL). В одном аспекте антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR тяжелой цепи и легкой цепи (например, CDR по Kabat, Chothia, IMGT и/или объединенные CDR), представленные в таблице 3 и описанные ниже.

[399] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 4, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Kabat. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 5, 6, 3, 17, 18 и 19 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Chothia. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно, в соответствии с объединенной схемой нумерации. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 7, 8, 9, 20, 18, и 16 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по IMGT. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержится в NVS11, как представлено в таблице 3.

[400] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 28, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Kabat. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 29, 30, 27, 41, 42 и 43 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Chothia. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 25, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно, в соответствии с объединенной схемой нумерации. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под

SEQ ID NO: 31, 32, 33, 44, 42, и 40 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по IMGТ. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержится в NVS12, как представлено в таблице 3.

[401] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 28, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Kabat. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 29, 51, 50, 61, 62 и 63 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Chothia. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 25, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно, в соответствии с объединенной схемой нумерации. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 31, 52, 53, 64, 62 и 60 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по IMGТ. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержится в NVS13, как представлено в таблице 3.

[402] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 72, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Kabat. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 73, 74, 71, 85, 18 и 86 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Chothia. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 69, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно, в соответствии с объединенной схемой нумерации. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 75, 76, 77, 87, 18 и 84 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по IMGТ. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержится в NVS14, как представлено в таблице 3.

[403] Кроме того, в настоящем изобретении также предусмотрена связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС, содержащая аминокислотные последовательности, гомологичные последовательностям CDR, описанным на всем протяжении и в таблице 3, и при этом связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС связывается с ВТС и сохраняет желаемые функциональные свойства описанных в данном документе последовательностей. Более конкретно аминокислотные последовательности связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС могут иметь большую или равную 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с последовательностями CDR, как описано на всем протяжении и представлено в таблице

3, и сохранять их желаемые функциональные свойства.

[404] В настоящем изобретении также предусмотрены связывающие функциональные единицы на основе антитела к ВТС, которые являются гомологичными последовательностям VH и VL, описанным в данном документе. Более конкретно в настоящем изобретении предусмотрен белок, содержащий аминокислотные последовательности, которые гомологичны последовательностям, таким как те, что описаны в таблице 3, и при этом связывающие функциональные единицы на основе антитела к ВТС связываются с офтальмологической мишенью и сохраняют желаемые функциональные свойства описанных в таблице 3 и примерах. Связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС, содержащая области VH и VL с менее чем 100% идентичностью последовательности с областями VH и VL, описанными в таблице 3, может быть получена с помощью мутагенеза (например, сайт-направленного или опосредованного PCR мутагенеза) молекул нуклеиновой кислоты, описанных в таблице 3, с последующим испытанием кодируемого измененного антитела на сохранение функции с применением функциональных анализов, описанных в данном документе и в US 20120014958. Связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС, содержащая тяжелую цепь и легкую цепь с высокой (т. е. 80% или больше) идентичностью с тяжелыми цепями и легкими цепями, описанными в таблице 3, может быть получена с помощью мутагенеза (например, сайт-направленного или опосредованного PCR мутагенеза) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих такие полипептиды, с последующим испытанием кодируемого измененного антитела на сохранение функции с применением функциональных анализов, описанных в данном документе.

[405] Связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС по настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно. Предполагается, что вариабельность может быть в области CDR или каркасной области. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС,

содержащая VH и VL, содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC представляет собой NVS11, как представлено в таблице 3. В другом аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 116 и 122 соответственно. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно. В другом аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[406] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC по настоящему изобретению содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно. Предполагается, что вариабельность может быть в области CDR или каркасной области. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC, содержащая VH и VL, содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC представляет собой NVS12, как представлено в таблице 3. В другом аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 127 и 132 соответственно. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно. В другом аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[407] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС по настоящему изобретению содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно. Предполагается, что вариабельность может быть в области CDR или каркасной области. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС, содержащая VH и VL, содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС представляет собой NVS13, как представлено в таблице 3. В другом аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 137 и 142 соответственно. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно. В другом аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[408] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС по настоящему изобретению содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно. Предполагается, что вариабельность может быть в области CDR или каркасной области. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС, содержащая VH и VL, содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС представляет собой NVS14, как представлено в таблице 3. В другом аспекте VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 147 и 151 соответственно. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно. В другом аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[409] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС по настоящему изобретению содержит 1) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие SEQ ID NO: 1, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 4, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 5, 6, 3, 17, 18 и 19 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 7, 8, 9, 20, 18 и 16 соответственно (схема нумерации по IMGT), и 2) VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержится в NVS11, как представлено в таблице 3.

[410] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС по настоящему изобретению содержит 1) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие SEQ ID NO: 25, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 28, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 29, 30, 27, 41, 42 и 43 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 31, 32, 33, 44, 42 и 40 соответственно (схема нумерации по IMGT), и 2) VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержится в NVS12, как представлено в таблице 3.

[411] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС по настоящему изобретению содержит 1) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие SEQ ID NO: 25, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 28, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 29, 51, 50, 61, 62 и 63 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 31, 52, 53, 64, 62 и 60 соответственно (схема нумерации по IMGT), и 2)

VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержится в NVS13, как представлено в таблице 3.

[412] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC по настоящему изобретению содержит 1) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие SEQ ID NO: 69, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 72, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 73, 74, 71, 85, 18 и 86 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 75, 76, 77, 87, 18 и 84 соответственно (схема нумерации по IMGT) и 2) VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержится в NVS14, как представлено в таблице 3.

Связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF

[413] В настоящем изобретении также предусмотрена связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF, содержащаяся в мультиспецифической связывающей молекуле. В конкретных аспектах связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (HCDR1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (HCDR2), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (HCDR3), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (LCDR1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (LCDR2) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (LCDR3). HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержатся в варибельной области тяжелой цепи (VH). LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержатся в варибельной области легкой цепи (VL). В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит CDR тяжелой цепи и легкой цепи (например, CDR по Kabat, Chothia, IMGT и/или объединенные CDR), как представлено в таблице 2 или 3 и описано ниже. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент, которые подавляют (например, частично подавляют) активность VEGF.

[414] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 95, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по Kabat. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 96, 97, 94, 108, 109 и 110 соответственно, в соответствии

со схемой нумерации по Chothia. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 92, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно, в соответствии с объединенной схемой нумерации. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 98, 99, 100, 111, 109 и 107 соответственно, в соответствии со схемой нумерации по IMGT. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой NVS8, как представлено в таблице 2, или содержится в любом из NVS11-NVS14, как представлено в таблице 3. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой бролуцизумаб (Beovu®).

[415] Кроме того, в настоящем изобретении также предусмотрена связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF, содержащая аминокислотные последовательности, которые являются гомологичными последовательностям CDR, описанным на всем протяжении и в таблице 2 или 3, и при этом связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF связывается с VEGF и сохраняет желаемые функциональные свойства описанных в данном документе последовательностей. Более конкретно аминокислотные последовательности связывающей функциональной единицы на основе антитела к VEGF могут иметь большую или равную 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с последовательностями CDR, как описано на всем протяжении данного документа и представлено в таблице 2 или 3, и сохраняют их желаемые функциональные свойства.

[416] В настоящем изобретении также предусмотрены связывающие функциональные единицы на основе антитела к VEGF, которые являются гомологичными последовательностям VH и VL, описанным в данном документе. Более конкретно, в настоящем изобретении предусмотрен белок, содержащий аминокислотные последовательности, которые являются гомологичными последовательностям, таким как те, что описаны в таблице 2 или 3, и при этом связывающие функциональные единицы на основе антитела к VEGF связывают офтальмологическую мишень и сохраняют желаемые функциональные свойства описанных в таблице 2 или 3 и в примерах последовательностей. Связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF, содержащая области VH и VL с менее чем 100% идентичностью последовательности с областями VH и VL, описанными в таблице 2 или 3, может быть получена с помощью мутагенеза (например, сайт-направленного или опосредованного PCR мутагенеза) молекул нуклеиновой кислоты, описанных в таблице 2 или 3, с последующим испытанием кодируемого измененного антитела на сохранение функции с применением функциональных анализов, описанных в данном документе и в US 20120014958. Связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF, содержащая тяжелую цепь и легкую цепь с высокой (т. е. 80% или больше) идентичностью с тяжелыми цепями и легкими цепями, описанными в таблице 2 или 3, может быть получена с помощью

мутагенеза (например, сайт-направленного или опосредованного PCR мутагенеза) молекул нуклеиновая кислота, кодирующих такие полипептиды, с последующим испытанием кодируемого измененного антитела на сохранение функции с применением функциональных анализов, описанных в данном документе.

[417] Связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF по настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно. Предполагается, что переменность может быть в области CDR или каркасной области. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF, содержащая VH и VL, содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой NVS8, как представлено в таблице 2, или содержится в любом из NVS11-NVS14, как представлено в таблице 3. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно. В другом аспекте различия в аминокислотной последовательности не находятся в пределах определяющих комплементарность областей.

[418] В одном аспекте VH и VL связывающей функциональной единицы на основе антитела к VEGF кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 102 и 113 соответственно. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой NVS8, как представлено в таблице 2.

[419] В одном аспекте VH и VL связывающей функциональной единицы на основе антитела к VEGF кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 117 и 123 соответственно. В одном аспекте связывающая

функциональная единица на основе антитела к VEGF содержится в NVS11, как представлено в таблице 3.

[420] В одном аспекте VH и VL связывающей функциональной единицы на основе антитела к VEGF кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 128 и 133 соответственно. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержится в NVS12, как представлено в таблице 3.

[421] В одном аспекте VH и VL связывающей функциональной единицы на основе антитела к VEGF кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 138 и 143 соответственно. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержится в NVS13, как представлено в таблице 3.

[422] В одном аспекте VH и VL связывающей функциональной единицы на основе антитела к VEGF кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 148 и 152 соответственно. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержится в NVS14, как представлено в таблице 3.

[423] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF по настоящему изобретению содержит 1) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие SEQ ID NO: 92, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 95, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 96, 97, 94, 108, 109 и 110 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 98, 99, 100, 111, 109 и 107 соответственно (схема нумерации по IMGT), и 2) VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой NVS8, как представлено в таблице 2, или содержится в любом из NVS11-NVS14, как представлено в таблице 3. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF подавляет (например, частично подавляет) активность VEGF.

[424] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF по настоящему изобретению (например, связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF, которая подавляет активность VEGF) содержит тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере

мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 103 и 114 соответственно. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 103 и 114 соответственно. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой NVS8, как представлено в таблице 2. В другом аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 104 и 115 соответственно. В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит тяжелую цепь и легкую цепь, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 104 и 115 соответственно, и представляет собой NVS8, как представлено в таблице 2.

Биспецифическая связывающая молекула

[425] В конкретных аспектах настоящее изобретение представлено мультиспецифической связывающей молекулой, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF. В настоящем изобретении представлена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, 1) где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела к BTC, представленные в таблице 1 (например, NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4); и 2) где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела к VEGF, представленные в таблице 2 или 3. В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой NVS11, представленную в таблице 3.

[426] В настоящем изобретении представлена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, 1) где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит 1) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие SEQ ID NO: 1, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 4, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 5, 6, 3, 17, 18 и 19 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 7, 8, 9, 20, 18 и 16 соответственно (схема нумерации по IMGT); и 2) где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит SEQ ID NO: 92, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 95, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 96, 97, 94, 108, 109 и 110 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 98, 99, 100, 111, 109 и 107 соответственно (схема нумерации по IMGT). В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой NVS11, представленную в таблице 3. В одном аспекте такая мультиспецифическая связывающая молекула 1) селективно связывается с белком BTC человека и подавляет активность BTC (например, частично подавляет) и 2) селективно связывается с белком VEGF человека и подавляет активность VEGF (например, частично подавляет).

[427] Также в настоящем изобретении представлена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, 1) где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит 1) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие SEQ ID NO: 25, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 28, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 29, 30, 27, 41, 42 и 43 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 31, 32, 33, 44, 42 и 40 соответственно (схема нумерации по IMGT); и 2) где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит SEQ ID NO: 92, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 95, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 96, 97, 94, 108, 109 и 110 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 98, 99, 100, 111, 109 и 107 соответственно (схема нумерации по IMGT). В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой NVS12, представленную в таблице 3.

[428] Также в настоящем изобретении представлена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, 1)

где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит 1) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие SEQ ID NO: 25, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 28, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 29, 51, 50, 61, 62 и 63 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 31, 52, 53, 64, 62 и 60 соответственно (схема нумерации по IMGT); и 2) где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит SEQ ID NO: 92, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 95, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 96, 97, 94, 108, 109 и 110 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 98, 99, 100, 111, 109 и 107 соответственно (схема нумерации по IMGT). В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой NVS13, представленную в таблице 3.

[429] Также в настоящем изобретении представлена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, 1) где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит 1) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие SEQ ID NO: 69, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 72, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 73, 74, 71, 85, 18 и 86 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 75, 76, 77, 87, 18 и 84 соответственно (схема нумерации по IMGT); и 2) где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит SEQ ID NO: 92, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно (объединенная схема нумерации); SEQ ID NO: 95, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно (схема нумерации по Kabat); SEQ ID NO: 96, 97, 94, 108, 109 и 110 соответственно (схема нумерации по Chothia) или SEQ ID NO: 98, 99, 100, 111, 109 и 107 соответственно (схема нумерации по IMGT). В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой NVS14, представленную в таблице 3.

[430] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит 1) VHA и VLA, которые связываются с BTC, где VHA и VLA содержат аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по

меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно; и 2) VHB и VLB, которые связываются с VEGF, где VHB и VLB содержат аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно. В другом аспекте мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит 1) VHA и VLA, которые связываются с BTC, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно; и 2) VHB и VLB, которые связываются с VEGF, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно. В другом аспекте VHA и VLA кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 116 и 122 соответственно. В другом аспекте VHB и VLB кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 117 и 123 соответственно. В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой NVS11, представленную в таблице 3. В одном аспекте такая мультиспецифическая связывающая молекула 1) селективно связывается с белком BTC человека и подавляет активность BTC (например, частично подавляет) и 2) селективно связывается с белком VEGF человека и подавляет активность VEGF (например, частично подавляет).

[431] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит 1) VHA и VLA, которые связываются с BTC, где VHA и VLA содержат аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно; и 2) VHB и VLB, которые связываются с VEGF, где VHB и VLB содержат аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно. В другом аспекте мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит 1) VHA и VLA, которые связываются с BTC, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно; и 2) VHB и VLB, которые связываются с VEGF, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно. В другом аспекте VHA и VLA кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 127 и 132 соответственно. В

другом аспекте VNB и VLB кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 128 и 133 соответственно. В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой NVS12, представленную в таблице 3. В одном аспекте такая мультиспецифическая связывающая молекула 1) селективно связывается с белком BTC человека и подавляет активность BTC (например, частично подавляет) и 2) селективно связывается с белком VEGF человека и подавляет активность VEGF (например, частично подавляет).

[432] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит 1) VNA и VLA, которые связываются с BTC, где VNA и VLA содержат аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно; и 2) VNB и VLB, которые связываются с VEGF, где VNB и VLB содержат аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью

последовательности с SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно. В другом аспекте мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит 1) VHA и VLA, которые связываются с BTC, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно; и 2) VHB и VLB, которые связываются с VEGF, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно. В другом аспекте VHA и VLA кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 137 и 142 соответственно. В другом аспекте VHB и VLB кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 138 и 143 соответственно. В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой NVS13, представленную в таблице 3. В одном аспекте такая мультиспецифическая связывающая молекула 1) селективно связывается с белком BTC человека и подавляет активность BTC (например, частично подавляет) и 2) селективно связывается с белком VEGF человека и подавляет активность VEGF (например, частично подавляет).

[433] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит 1) VHA и VLA, которые связываются с BTC, где VHA и VLA содержат аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с

SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно; и 2) VHB и VLB, которые связываются с VEGF, где VHB и VLB содержат аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно. В другом аспекте мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит 1) VHA и VLA, которые связываются с BTC, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно; и 2) VHB и VLB, которые связываются с VEGF, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно. В другом аспекте VHA и VLA кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 147 и 151 соответственно. В другом аспекте VHB и VLB кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 148 и 152 соответственно. В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой NVS14, представленную в таблице 3. В одном аспекте такая мультиспецифическая связывающая молекула 1) селективно связывается с белком BTC человека и подавляет активность BTC (например, частично подавляет) и 2) селективно связывается с белком VEGF человека и подавляет активность VEGF (например, частично подавляет).

[434] Мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению

содержит 1) тяжелую цепь, содержащую VHA, CH1A, линкер, VHB и CH1B, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 120; и 2) легкую цепь, содержащую VLA, СКА, линкер, VLB и СКВ, где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 125. В одном аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 121 и 126 соответственно. В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 120, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 125, указанные применительно к NVS11, представленной в таблице 3. В одном аспекте такая мультиспецифическая связывающая молекула 1) селективно связывается с белком BTC

человека и подавляет активность BTC (например, частично подавляет) и 2) селективно связывается с белком VEGF человека и подавляет активность VEGF (например, частично подавляет).

[435] Мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит 1) тяжелую цепь, содержащую VHA, CH1A, линкер, VHB и CH1B, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 130, и 2) легкую цепь, содержащую VLA, СКА, линкер, VLB и СКВ, где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 135. В одном аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 131 и 136 соответственно. В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная

цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 130, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 135, указанные применительно к NVS12, представленной в таблице 3. В одном аспекте такая мультиспецифическая связывающая молекула 1) селективно связывается с белком BTC человека и подавляет активность BTC (например, частично подавляет) и 2) селективно связывается с белком VEGF человека и подавляет активность VEGF (например, частично подавляет).

[436] Мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит 1) тяжелую цепь, содержащую VHA, CH1A, линкер, VHB и CH1B, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 140; и 2) легкую цепь, содержащую VLA, СКА, линкер, VLB и СКВ, где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 145. В одном аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере

мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 141 и 146 соответственно. В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 140, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145, указанные применительно к NVS13, представленной в таблице 3. В одном аспекте такая мультиспецифическая связывающая молекула 1) селективно связывается с белком BTC человека и подавляет активность BTC (например, частично подавляет) и 2) селективно связывается с белком VEGF человека и подавляет активность VEGF (например, частично подавляет).

[437] Мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит 1) тяжелую цепь, содержащую VHA, CH1A, линкер, VHB и CH1B, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 149; и 2) легкую цепь, содержащую VLA, СКА, линкер, VLB и СКВ, где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность с приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 154. В одном аспекте тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с приблизительно по меньшей

мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 150 и 155 соответственно. В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 149, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 154, указанные применительно к NVS14, представленной в таблице 3. В одном аспекте такая мультиспецифическая связывающая молекула 1) селективно связывается с белком BTC человека и подавляет активность BTC (например, частично подавляет) и 2) селективно связывается с белком VEGF человека и подавляет активность VEGF (например, частично подавляет).

[438] Мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению (например, NVS11-NVS14) может:

одновременно связываться с BTC и VEGF;

подавлять связывание растворимой формы BTC с ErbB1 или Erb4 и последующее фосфорилирование рецепторов Erb;

подавлять фосфорилирование ERK1/2, индуцированное растворимой формой BTC;

связываться с мембраносвязанным BTC и подавлять юкстакринную активацию фосфорилирования ErbB1, индуцированного мембраносвязанным BTC;

подавлять связывание растворимой формы VEGF-A165 с растворимой формой VEGFR2;

ограничивать проницаемость полученного из iPSC человека RPE, индуцированную BTC, в модели внешнего BRB in vitro;

ограничивать проницаемость эндотелиальных клеток сетчатки человека (HREC), индуцированную VEGF, в модели внутреннего BRB in vitro;

подавлять утолщение сетчатки, индуцированное BTC; и/или

подавлять утечку жидкости через сосуды сетчатки, индуцированную VEGF.

Таблица 2. Иллюстративный Fab к VEGF

NVS8		
SEQ ID NO: 92 (комбинированная)	HCDR1	GFSLTDYYMYMT
SEQ ID NO: 93 (комбинированная)	HCDR2	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 94 (комбинированная)	HCDR3	GDHNSGWGLDI

SEQ ID NO: 95 (Kabat)	HCDR1	DYYMT
SEQ ID NO: 93 (Kabat)	HCDR2	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 94 (Kabat)	HCDR3	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 96 (Chothia)	HCDR1	GFSLTDYY
SEQ ID NO: 97 (Chothia)	HCDR2	DPDDD
SEQ ID NO: 94 (Chothia)	HCDR3	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 98 (IMGT)	HCDR1	GFSLTDYYY
SEQ ID NO: 99 (IMGT)	HCDR2	IDPDDDP
SEQ ID NO: 100 (IMGT)	HCDR3	AGGDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 101	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDY YYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYAT WAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 102	ДНК, кодирующая VH	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGGGGCGGA CTGGTGCAGCCCGGTGGATCTTTGCGCCTGT CCTGTACAGCTTCTGGCTTCTCCTTGACCGA CTACTATTACATGACTTGGGTTCCGCAAGCC CCAGGCAAAGGGCTTGAATGGGTGGGGTTC ATTGACCCCGACGATGATCCTTACTACGCC ACATGGGCAAAGGGCCGGTTTACTATCAGC CGGGATAATTCCAAAAACACATTGTATTTG CAAATGAACTCACTGAGAGCAGAAGATACG GCTGTGTA CTATTGCGCAGGCGGCGATCAT AACTCCGGCTGGGGCCTGGACATCTGGGGG CAGGGGACCCTGGTGACAGTCAGCTCA

SEQ ID NO: 103	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDY YYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYAT WAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDRVE PKSC
SEQ ID NO: 104	ДНК, кодирующая тяжелую цепь	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGGGGCGGA CTGGTGCAGCCCGGTGGATCTTTGCGCCTGT CCTGTACAGCTTCTGGCTTCTCCTTGACCGA CTACTATTACATGACTTGGGTTCGCCAAGCC CCAGGCAAAGGGCTTGAATGGGTGGGGTTC ATTGACCCCGACGATGATCCTTACTACGCC ACATGGGCAAAGGGCCGGTTTACTATCAGC CGGGATAATTCCAAAAACACATTGTATTTG CAAATGAACTCACTGAGAGCAGAAGATACG GCTGTGTAATAATTGCGCAGGCGGCGATCAT AACTCCGGCTGGGGCCTGGACATCTGGGGG CAGGGGACCCTGGTGACAGTCAGCTCAGCC TCAACGAAGGGGCCAGCGTGTTTCCTTTG GCCCCAAGCAGCAAGTCCACGTCCGGTGGG ACTGCAGCTCTTGGTTGTCTGGTCAAGGATT ATTTCCCAGAACCCGTGACCGTGTCTTGGA ACAGTGGTGCATTGACATCAGGAGTGCATA CATTCCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCTGGCCT GTATAGCCTTTCCTCTGTTGTACGGTGCCC AGCTCCAGCCTGGGGACGCAGACCTATATT TGTAACGTGAACCATAAACCCCTCCAACACC AAGGTTGATAAAAGAGTGGAGCCCAAGTCT TGT
SEQ ID NO: 105 (комбинированная)	LCDR1	QASEIHSWLA
SEQ ID NO: 106 (комбинированная)	LCDR2	LASTLAS

SEQ ID NO: 107 (комбинированная)	LCDR3	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 105 (Kabat)	LCDR1	QASEIIHSWLA
SEQ ID NO: 106 (Kabat)	LCDR2	LASTLAS
SEQ ID NO: 107 (Kabat)	LCDR3	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 108 (Chothia)	LCDR1	SEIIHSW
SEQ ID NO: 109 (Chothia)	LCDR2	LAS
SEQ ID NO: 110 (Chothia)	LCDR3	VYLASTNGA
SEQ ID NO: 111 (IMGT)	LCDR1	EIIHSW
SEQ ID NO: 109 (IMGT)	LCDR2	LAS
SEQ ID NO: 107 (IMGT)	LCDR3	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 112	VL	EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLA WYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFGSGG SGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNVYLASTNG ANFGQGTKLTVLK
SEQ ID NO: 113	ДНК, кодирующая VL	GAGATTGTGATGACTCAGAGCCCTCAACG CTGTCTGCATCCGTAGGTGATCGCGTCATTA TTACCTGTCAAGCCTCAGAGATCATTCACTC TTGGCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGG TAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTATCTTGCT TCAACCCTCGCGAGCGGGGTGCCCTCCCGC TTCAGCGGCTCCGGCTCTGGTGCCGAATTTA CCCTGACAATCAGCTCTCTCCAACCCGATG ATTTTCGCGACTTACTACTGTCAGAATGTCTA CTTGGCCTCAACCAACGGAGCCAACCTTCGG

		CCAGGGGACCAAACCTGACCGTCCTTAAG
SEQ ID NO: 114	Легкая цепь	EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLA WYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSG SGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQNVYLASTNG ANFGQGTKLTVLKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 115	ДНК, кодирующая легкую цепь	GAGATTGTGATGACTCAGAGCCCTTCAACG CTGTCTGCATCCGTAGGTGATCGCGTCATTA TTACCTGTCAAGCCTCAGAGATCATTCATC TTGGCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGG TAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTATCTTGCT TCAACCCTCGCGAGCGGGGTGCCCTCCCGC TTCAGCGGCTCCGGCTCTGGTGCCGAATTTA CCCTGACAATCAGCTCTCTCCAACCCGATG ATTTTCGCGACTTACTACTGTCAGAATGTCTA CTTGGCCTCAACCAACGGAGCCAACCTTCGG CCAGGGGACCAAACCTGACCGTCCTTAAGCG TACGGTGGCAGCTCCGTCTGTTTTTCATCTTT CCACCTAGCGACGAGCAACTCAAAGTGGT ACAGCATCCGTGGTTTGTCTGCTGAACAATT TTACCCAGGGAGGCTAAGGTCCAGTGGA AAGTCGATAACGCTCTTCAGTCTGGCAACA GTCAGGAGAGCGTCACAGAGCAGGACTCTA AGGATAGCACTTATAGTCTGTCCCTCCACGCT GACACTGTCTAAAGCGGATTATGAGAAGCA CAAGGTTTACGCCTGTGAGGTAACGCACCA AGGACTCTCCTCCCCAGTTACCAAATCTTTC AACAGAGGAGAATGT

Таблица 3. Иллюстративные биспецифические Fab к BTC/к VEGF

NVS11		
SEQ ID NO: 1 (комбиниров	HCDR1 1	GGTFSSYAIS

анная)		
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2 1	GIVPWMGEAVYAQKFQG
SEQ ID NO: 3 (комбинированная)	HCDR3 1	SSSTYGIHAFDY
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1 1	SYAIS
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2 1	GIVPWMGEAVYAQKFQG
SEQ ID NO: 3 (Kabat)	HCDR3 1	SSSTYGIHAFDY
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1 1	GGTFSSY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2 1	VPWMGE
SEQ ID NO: 3 (Chothia)	HCDR3 1	SSSTYGIHAFDY
SEQ ID NO: 7 (IMGT)	HCDR1 1	GGTFSSYA
SEQ ID NO: 8 (IMGT)	HCDR2 1	IVPWMGEA
SEQ ID NO: 9 (IMGT)	HCDR3 1	ARSSSTYGIHAFDY
SEQ ID NO: 10	VH 1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGGIVPWMGEAVYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSSSTYGIHAFDYW GQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 116	ДНК, кодирующая VH 1	CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAG AAACCCGGCTCCTCCGTGAAAGTGTCTGCAAGGCC TCCGGCGGCACCTTCTCCAGCTACGCCATCTCCTGGG

		TCCGACAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGG GCGGCATCGTGCCTTGGATGGGCGAGGCCGTGTACG CCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCG ACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGTCCTC CCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTCCTCCTCCACCTACGGCATCCACGCCTTCGAC TACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCC
SEQ ID NO: 92 (комбинированная)	HCDR1 2	GFSLTDYYMT
SEQ ID NO: 93 (комбинированная)	HCDR2 2	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 94 (комбинированная)	HCDR3 2	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 95 (Kabat)	HCDR1 2	DYYMT
SEQ ID NO: 93 (Kabat)	HCDR2 2	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 94 (Kabat)	HCDR3 2	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 96 (Chothia)	HCDR1 2	GFSLTDYY
SEQ ID NO: 97 (Chothia)	HCDR2 2	DPDDD
SEQ ID NO: 94 (Chothia)	HCDR3 2	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 98 (IMGT)	HCDR1 2	GFSLTDYYY
SEQ ID NO:	HCDR2 2	IDPDDDP

99 (IMGT)		
SEQ ID NO: 100 (IMGT)	HCDR3 2	AGGDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 101	VH 2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTW VRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIW GQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 117	ДНК, кодирующая VH 2	GAAGTCCAGCTGGTGGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTG CAGCCAGGCGGATCCCTGAGGCTGTCTTGCACCGCC TCCGGCTTCTCCCTGACCGACTACTACTACATGACTT GGGTCCGCCAGGCTCCCGGAAAAGGACTGGAGTGGG TCGGATTCATCGACCCCGACGACGCCCTACTACG CCACCTGGGCCAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGG ACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACT CCCTGAGGGCCGAAGATACAGCTGTGTACTATTGCG CTGGCGGCGACCACAACCTCCGGCTGGGGCCTGGATA TCTGGGGACAGGGAACACTCGTGACAGTGTCCAGC
SEQ ID NO: 118	НС-линкер	GSGGGGSGGGGSGGG
SEQ ID NO: 119	ДНК, кодирующая НС-линкер	GGCTCTGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTAGC GGAGGCGGA
SEQ ID NO: 120	Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGGIVPWMGEAVYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSSSTYGIHAFDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCG SGGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCT ASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPY YATWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSVTVVPSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSC

<p>SEQ ID NO: 121</p>	<p>ДНК, кодирующая тяжелую цепь</p>	<p>CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAG AAACCCGGCTCCTCCGTGAAAGTGTCTGCAAGGCC TCCGGCGGCACCTTCTCCAGCTACGCCATCTCCTGGG TCCGACAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGG GCGGCATCGTGCCTTGGATGGGCGAGGCCGTGTACG CCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCG ACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCTC CCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTCTCCTCCACCTACGGCATCCACGCCTTCGAC TACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCTCC GCCTCCACCAAGGGACCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCC CTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACCGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACCGTGTCTTGAAGTCTGGCGCCCTGACCTCCGG CGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGC CTGTACTCCCTGTCTCCGTCGTGACCGTGCCTCCA GCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ACCACAAGCCCTCCAACACCAAAGTGGACAAGCGGG TGGAACCCAAGTCTGCGGCTCTGGCGGCGGAGGAT CTGGCGGAGGCGGTAGCGGAGGCGGAGAAGTCCAG CTGGTGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCAGGC GGATCCCTGAGGCTGTCTTGCACCGCCTCCGGCTTCT CCCTGACCGACTACTACTACATGACTTGGGTCCGCCA GGCTCCCGGAAAAGGACTGGAGTGGGTTCGATTTCAT CGACCCCGACGACGACCCCTACTACGCCACCTGGGC CAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACCTCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGC CGAAGATACAGCTGTGTACTATTGCGCTGGCGGCGA CCACAACCTCCGGCTGGGGCCTGGATATCTGGGGACA GGGAACACTCGTGACAGTGTCCAGCGCCAGCACCAA GGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAG TCTACCTCTGGCGGCACCGCTGCTCTGGGCTGCCTGG TGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTG GAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTC CCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGT</p>
---------------------------	---	---

		CCTCCGTGGTGACAGTGCCTTCCTCCAGCCTGGGCAC CCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTC CAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTC ATGC
SEQ ID NO: 14 (комбинированная)	LCDR1 1	RASQISISNFLN
SEQ ID NO: 15 (комбинированная)	LCDR2 1	AASNLQS
SEQ ID NO: 16 (комбинированная)	LCDR3 1	QQYDDFPMT
SEQ ID NO: 14 (Kabat)	LCDR1 1	RASQISISNFLN
SEQ ID NO: 15 (Kabat)	LCDR2 1	AASNLQS
SEQ ID NO: 16 (Kabat)	LCDR3 1	QQYDDFPMT
SEQ ID NO: 17 (Chothia)	LCDR1 1	SQISISNF
SEQ ID NO: 18 (Chothia)	LCDR2 1	AAS
SEQ ID NO: 19 (Chothia)	LCDR3 1	YDDFPM
SEQ ID NO: 20 (IMGT)	LCDR1 1	QISISNF
SEQ ID NO: 18 (IMGT)	LCDR2 1	AAS
SEQ ID NO: 16 (IMGT)	LCDR3 1	QQYDDFPMT

SEQ ID NO: 21	VL 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISINFLNWFYQQK PGKAPKLLIYAASNLRSGVPSRFRSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYYCQQYDDFPMTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 122	ДНК, кодирующая VL 1	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCAGCCTGTCC GCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCGG GCCTCCCAGTCTATCTCCAACCTCCTGAACTGGTATC AGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCT ACGCCGCCTCCAACCTGCAGTCCGGCGTGCCCTCCA GATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCAC CTACTACTGCCAGCAGTACGACGACTTCCCCATGAC CTTCGGCCAGGGCACCAAAGTGGAATCAAG
SEQ ID NO: 105 (комбинированная)	LCDR1 2	QASEIHSWLA
SEQ ID NO: 106 (комбинированная)	LCDR2 2	LASTLAS
SEQ ID NO: 107 (комбинированная)	LCDR3 2	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 105 (Kabat)	LCDR1 2	QASEIHSWLA
SEQ ID NO: 106 (Kabat)	LCDR2 2	LASTLAS
SEQ ID NO: 107 (Kabat)	LCDR3 2	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 108 (Chothia)	LCDR1 2	SEIHSW
SEQ ID NO:	LCDR2 2	LAS

109 (Chothia)		
SEQ ID NO: 110 (Chothia)	LCDR3 2	VYLASTNGA
SEQ ID NO: 111 (IMGT)	LCDR1 2	EIIHSW
SEQ ID NO: 109 (IMGT)	LCDR2 2	LAS
SEQ ID NO: 107 (IMGT)	LCDR3 2	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 112	VL 2	EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIHSWLAWYQQK PGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQ PDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLK
SEQ ID NO: 123	ДНК, кодирующая VL 2	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCTAGCACCCCTGAGC GCCAGCGTGGGAGATCGCGTGATCATCACATGCCAG GCCTCCGAGATCATCCACAGCTGGCTGGCTTGGTATC AGCAGAAACCTGGAAAAGCTCCCAAGCTCCTGATCT ATCTGGCCAGCACCCCTGGCCTCTGGCGTGCCCAGCA GATTCAGCGGCTCCGGCAGCGGCGCTGAGTTTACCC TGACAATCAGCTCCCTGCAGCCTGACGATTTTGCTAC CTACTATTGTCAGAACGTGTACCTGGCCTCCACCAAC GGCGCCAACTTTGGCCAGGGAACAAAGCTGACCGTG CTGAAG
SEQ ID NO: 118	LC-линкер	GSGGGGSGGGGSGGG
SEQ ID NO: 124	ДНК, кодирующая LC-линкер	GGCTCCGGCGGAGGCGGATCTGGTGGCGGAGGATCT GGCGGTGGC
SEQ ID NO: 125	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNFLNHWYQQK PGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQYDDFPMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVY

		<p>ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGSGGGGSGGGGSGGG EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQK PGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQ PDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>SEQ ID NO: 126</p>	<p>ДНК, кодирующая легкую цепь</p>	<p>GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCAGCCTGTCC GCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCG GCCTCCCAGTCTATCTCCAACCTCCTGAACTGGTATC AGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCT ACGCCGCCTCCAACCTGCAGTCCGGCGTGCCCTCCA GATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCAC CTACTACTGCCAGCAGTACGACGACTTCCCCATGAC CTTCGGCCAGGGCACCAAAGTGGAAATCAAGCGGAC CGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCACCCTCC GACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGCTG TGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCTCGCGAGGCCAAA GTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACTCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAG GACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGT CCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCT GCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGA CCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGTGGCTCCGGCG GAGGCGGATCTGGTGGCGGAGGATCTGGCGGTGGCG AGATCGTGATGACCCAGTCCCCTAGCACCCCTGAGCG CCAGCGTGGGAGATCGCGTGATCATCATGCCAGG CCTCCGAGATCATCCACAGCTGGCTGGCTTGGTATCA GCAGAAACCTGGAAAAGCTCCCAAGCTCCTGATCTA TCTGGCCAGCACCCCTGGCCTCTGGCGTGCCCAGCAG ATTCAGCGGCTCCGGCAGCGGCGCTGAGTTTACCCT GACAATCAGCTCCCTGCAGCCTGACGATTTTGTACC TACTATTGTCAGAACGTGTACCTGGCCTCCACCAACG GCGCCAACCTTGGCCAGGGAACAAAGCTGACCGTGC</p>

		TGAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTT CCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGC CAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCG GGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC TGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT AAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTG TCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGGCGAG TGC
NVS12		
SEQ ID NO: 25 (комбинированная)	HCDR1 1	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 26 (комбинированная)	HCDR2 1	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 27 (комбинированная)	HCDR3 1	QRYYFGEFDL
SEQ ID NO: 28 (Kabat)	HCDR1 1	SYAMS
SEQ ID NO: 26 (Kabat)	HCDR2 1	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 27 (Kabat)	HCDR3 1	QRYYFGEFDL
SEQ ID NO: 29 (Chothia)	HCDR1 1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 30 (Chothia)	HCDR2 1	SGSGGS
SEQ ID NO:	HCDR3 1	QRYYFGEFDL

27 (Chothia)		
SEQ ID NO: 31 (IMGT)	HCDR1 1	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 32 (IMGT)	HCDR2 1	ISGSGGST
SEQ ID NO: 33 (IMGT)	HCDR3 1	ARQRYYFGEFDL
SEQ ID NO: 34	VH 1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQRYYFGEFDLWGQ GTLVTVSS
SEQ ID NO: 127	ДНК, кодирующая VH 1	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTG CAGCCTGGCGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGTGCCGCT CCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGGT CCGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTC CGCCATCTCCGGCTCCGGCGGCTCTACCTACTACGCC GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGAC AACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCC CTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGACAGCGGTACTACTTCGGCGAGTTCGACCTGTGG GGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCC
SEQ ID NO: 92 (комбинированная)	HCDR1 2	GFSLTDYYMYT
SEQ ID NO: 93 (комбинированная)	HCDR2 2	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 94 (комбинированная)	HCDR3 2	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO:	HCDR1 2	DYYMYT

95 (Kabat)		
SEQ ID NO: 93 (Kabat)	HCDR2 2	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 94 (Kabat)	HCDR3 2	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 96 (Chothia)	HCDR1 2	GFSLTDYY
SEQ ID NO: 97 (Chothia)	HCDR2 2	DPDDD
SEQ ID NO: 94 (Chothia)	HCDR3 2	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 98 (IMGT)	HCDR1 2	GFSLTDYYY
SEQ ID NO: 99 (IMGT)	HCDR2 2	IDPDDDP
SEQ ID NO: 100 (IMGT)	HCDR3 2	AGGDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 101	VH 2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYMTW VRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIW GQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 128	ДНК, кодирующая VH 2	GAAGTCCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTC CAGCCAGGCGGATCCCTGAGGCTCAGCTGCACCGCC TCTGGCTTCTCCCTGACCGACTACTACTATATGACTT GGGTCCGCCAGGCTCCCGGAAAAGGACTCGAATGGG TCGGATTCATCGACCCCGACGACGACCCTTACTACG CCACCTGGGCCAAGGGCAGATTCACCATCAGCAGAG ACAACAGCAAGAACACACTCTATCTCCAGATGAACT CCCTGAGGGCTGAAGATAACCGCTGTCTATTACTGCG CTGGCGGCGACCAACTCCGGCTGGGGCCTGGATA TCTGGGGACAGGGCACACTCGTGACAGTGTCCAGC
SEQ ID NO: 118	НС-линкер	GSGGGGSGGGGSGGG
SEQ ID NO:	ДНК,	GGCTCTGGCGGAGGCGGAAGTGGTGGCGGAGGATC

129	кодирующая НС-линкер	AGGCGGCGGA
SEQ ID NO: 130	Тяжелая цепь	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQRYFGEFDLWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGSG GGGSGGGGSGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS GFSLTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYA TWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAG GDHNSGWGLDIWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 131	ДНК, кодирующая тяжелую цепь	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTG CAGCCTGGCGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGTGCCGCCT CCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGGT CCGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTC CGCCATCTCCGGCTCCGGCGGCTCTACCTACTACGCC GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGAC AACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCC CTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGACAGCGGTACTACTTCGGCGAGTTCGACCTGTGG GGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCCGCCTCC ACCAAGGGACCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCA GCAAGTCCACCTCTGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCG TGCTCTGGAACTCCGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTAC TCCCTGTCTCCGTGCTGACCGTGCCCTCCAGCTCTC TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACA AGCCCTCCAACACCAAAGTGGACAAGCGGGTGGAAAC CCAAGTCCCTGCGGCTCTGGCGGAGGCGGAAGTGGTG GCGGAGGATCAGGCGGCGGAGAAGTCCAGCTGGTG

		GAAAGCGGCGGAGGCCTGGTCCAGCCAGGCGGATCC CTGAGGCTCAGCTGCACCGCCTCTGGCTTCTCCCTGA CCGACTACTACTATATGACTTGGGTCCGCCAGGCTCC CGGAAAAGGACTCGAATGGGTTCGATTCATCGACCC CGACGACGACCCTTACTACGCCACCTGGGCCAAGGG CAGATTCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACAC ACTCTATCTCCAGATGAACTCCCTGAGGGCTGAAGA TACCGCTGTCTATTACTGCGCTGGCGGCGACCACAA CTCCGGCTGGGGCCTGGATATCTGGGGACAGGGCAC ACTCGTGACAGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCC CTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCTACC TCTGGCGGCACCGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAG GACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGA CTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGC CGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCC GTGGTGACAGTGCCTTCCCTCCAGCCTGGGCACCCAG ACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAAC ACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCATGC
SEQ ID NO: 38 (комбинированная)	LCDR1 1	SGDKLGDKYAY
SEQ ID NO: 39 (комбинированная)	LCDR2 1	QDSKRPS
SEQ ID NO: 40 (комбинированная)	LCDR3 1	QAFDYLYSLGV
SEQ ID NO: 38 (Kabat)	LCDR1 1	SGDKLGDKYAY
SEQ ID NO: 39 (Kabat)	LCDR2 1	QDSKRPS
SEQ ID NO:	LCDR3 1	QAFDYLYSLGV

40 (Kabat)		
SEQ ID NO: 41 (Chothia)	LCDR1 1	DKLGDKY
SEQ ID NO: 42 (Chothia)	LCDR2 1	QDS
SEQ ID NO: 43 (Chothia)	LCDR3 1	FDYLYSLG
SEQ ID NO: 44 (IMGT)	LCDR1 1	KLGDKY
SEQ ID NO: 42 (IMGT)	LCDR2 1	QDS
SEQ ID NO: 40 (IMGT)	LCDR3 1	QAFDYLYSLGV
SEQ ID NO: 45	VL 1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYAYWYQQK PGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ AEDEADYYCQAFDYLYSLGVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 132	ДНК, кодирующая VL 1	TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCCGTGT CTCCTGGCCAGACCGCCTCCATCACCTGTTCCGGCGA CAAGCTGGGCGATAAGTACGCCTACTGGTATCAGCA GAAGCCCGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTACCA GGACTCCAAGCGGCCCTCCGGCATCCCTGAGCGGTT CTCCGGCTCCAACCTCCGGCAACACCGCCACCCTGAC CATCTCCGGCACCCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTA CTACTGCCAGGCCTTCGACTACCTGTACTCCCTGGGC GTGTTCCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 105 (комбинированная)	LCDR1 2	QASEIHSWLA
SEQ ID NO: 106 (комбинированная)	LCDR2 2	LASTLAS
SEQ ID NO:	LCDR3 2	QNVYLASTNGAN

107 (комбинированная)		
SEQ ID NO: 105 (Kabat)	LCDR1 2	QASEIIHSWLA
SEQ ID NO: 106 (Kabat)	LCDR2 2	LASTLAS
SEQ ID NO: 107 (Kabat)	LCDR3 2	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 108 (Chothia)	LCDR1 2	SEIIHSW
SEQ ID NO: 109 (Chothia)	LCDR2 2	LAS
SEQ ID NO: 110 (Chothia)	LCDR3 2	VYLASTNGA
SEQ ID NO: 111 (IMGT)	LCDR1 2	EIIHSW
SEQ ID NO: 109 (IMGT)	LCDR2 2	LAS
SEQ ID NO: 107 (IMGT)	LCDR3 2	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 112	VL 2	EIVMTQSPSTLSASVGD RVIITCQASEIIHSWLAWYQQK PGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQ PDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLK
SEQ ID NO: 133	ДНК, кодирующая VL 2	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCTTCCACCCTGTCCG CCTCCGTGGGCGACAGAGTGATCATCACCTGTCAGG CCTCCGAGATCATCCACAGCTGGCTGGCTTGGTATCA GCAGAAACCTGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA CCTGGCCTCCACCCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGA TTCTCCGGATCTGGCTCTGGCGCCGAGTTCACCCTGA CAATCAGCTCCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCT

		ACTACTGTCAGAACGTGTACCTGGCCAGCACCAACG GCGCCAACCTTCGGCCAGGGCACAAAACCTGACAGTGC TGAAG
SEQ ID NO: 118	LC-линкер	GSGGGGSGGGGSGGG
SEQ ID NO: 134	ДНК, кодирующая LC-линкер	GGCTCTGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTTCT GGCGGCGGA
SEQ ID NO: 135	Легкая цепь	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYAYWYQQK PGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ AEDEADYYCQAFDYLYSLGVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSGSGGGGSGGGGSGG GEIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASEIHSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISL QPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 136	ДНК, кодирующая легкую цепь	TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCCGTGT CTCCTGGCCAGACCGCCTCCATCACCTGTTCCGGCGA CAAGCTGGGCGATAAGTACGCCTACTGGTATCAGCA GAAGCCCGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTACCA GGACTCCAAGCGGCCCTCCGGCATCCCTGAGCGGTT CTCCGGCTCCAACCTCCGGCAACACCGCCACCCTGAC CATCTCCGGCACCCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTA CTACTGCCAGGCCTTCGACTACCTGTACTCCCTGGGC GTGTTCCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGC CAGCCCAAGGCCGCTCCTTCCGTGACCCTGTTCCCTC CATCCTCCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGGCCACCC TCGTGTGCCTGATCTCCGACTTCTACCCTGGCGCCGT GACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCTCTCCTGTGAA GGCCGGCGTGGAACCACCCCTTCCAAGCAGTC CAACAACAATAACGCCGCTCCTCCTACCTGTCCCTG

		ACCCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACCGGTCCTACAGC TGCCAAGTCACACACGAGGGCTCCACCGTGGAAAAG ACCGTGGCCCCTACCGAGTGCTCCGGCTCTGGTGGC GGAGGATCTGGCGGAGGCGGTTCTGGCGGCGGAGA GATCGTGATGACCCAGTCCCCTTCCACCCTGTCCGCC TCCGTGGGCGACAGAGTGATCATCACCTGTCAGGCC TCCGAGATCATCCACAGCTGGCTGGCTTGGTATCAG CAGAAACCTGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTAC CTGGCCTCCACCCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGAT TCTCCGGATCTGGCTCTGGCGCCGAGTTCACCCTGAC AATCAGCTCCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTA CTA CTGTCAGAACGTGTACCTGGCCAGCACCAACGG CGCCA ACTTCGGCCAGGGCACAAA ACTGACAGTGCT GAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTT CATCTTC CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCC AGCGTGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCCGG GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCT GCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGC AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCA CCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATA AAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGT CCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
NVS13		
SEQ ID NO: 25 (комбинированная)	HCDR1 1	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 49 (комбинированная)	HCDR2 1	GLGHVGYTTYTDSVKG
SEQ ID NO: 50 (комбинированная)	HCDR3 1	DYLDFGYFDV

анная)		
SEQ ID NO: 28 (Kabat)	HCDR1 1	SYAMS
SEQ ID NO: 49 (Kabat)	HCDR2 1	GLGHVGYTTYTDSVKG
SEQ ID NO: 50 (Kabat)	HCDR3 1	DYLDFGYFDV
SEQ ID NO: 29 (Chothia)	HCDR1 1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 51 (Chothia)	HCDR2 1	GHVGY
SEQ ID NO: 50 (Chothia)	HCDR3 1	DYLDFGYFDV
SEQ ID NO: 31 (IMGT)	HCDR1 1	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 52 (IMGT)	HCDR2 1	LGHVGYT
SEQ ID NO: 53 (IMGT)	HCDR3 1	ARDYLDFGYFDV
SEQ ID NO: 54	VH 1	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSGLGHVGYTTYTDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYLDFGYFDVWG QGTLVTVSS
SEQ ID NO: 137	ДНК, кодирующая VH 1	CAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTG CAGCCTGGCGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGTGCCGCCT CCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGGT CCGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTC CGGCCTGGGCCACGTGGGCTACACCACCTACACCGA CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAA CTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCT GAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG AGACTACCTGGACTTCGGCTACTACTTCGACGTGTGG GGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCCCTCC
SEQ ID NO:	HCDR1 2	GFSLTDYYMT

92 (комбинированная)		
SEQ ID NO: 93 (комбинированная)	HCDR2 2	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 94 (комбинированная)	HCDR3 2	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 95 (Kabat)	HCDR1 2	DYYMYT
SEQ ID NO: 93 (Kabat)	HCDR2 2	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 94 (Kabat)	HCDR3 2	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 96 (Chothia)	HCDR1 2	GFSLTDYY
SEQ ID NO: 97 (Chothia)	HCDR2 2	DPDDD
SEQ ID NO: 94 (Chothia)	HCDR3 2	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 98 (IMGT)	HCDR1 2	GFSLTDYYY
SEQ ID NO: 99 (IMGT)	HCDR2 2	IDPDDDP
SEQ ID NO: 100 (IMGT)	HCDR3 2	AGGDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 101	VH 2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYMYMTW VRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIW GQGTLVTVSS
SEQ ID NO:	ДНК,	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGTGGCGGAGGCCTCGTC

138	кодирующая VN 2	CAGCCAGGCGGATCCCTGAGGCTCAGCTGCACCGCC TCTGGCTTCTCCCTGACCGACTACTACTATATGACTT GGGTCCGCCAGGCTCCCGGAAAAGGACTCGAATGGG TCGGATTCATCGACCCCGACGACGCCCTACTACG CCACCTGGGCCAAGGGCAGATTCACCATCAGCAGAG ACAACAGCAAGAACACACTCTATCTCCAGATGAACT CCCTGAGGGCTGAAGATACCGCTGTCTATTACTGCG CTGGCGGCGACCACAACCTCCGGCTGGGGCCTGGATA TCTGGGGACAGGGCACACTCGTGACAGTGTCCAGC
SEQ ID NO: 118	НС-линкер	GSGGGGSGGGGSGGG
SEQ ID NO: 139	ДНК, кодирующая НС-линкер	GGCTCTGGCGGAGGCGGAAGTGGTGGCGGAGGATC AGGCGGCGGA
SEQ ID NO: 140	Тяжелая цепь	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSGLGHVGYTTYTDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYLDFGYFDVWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGS GGGSGGGGSGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTA SGFSLTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYY ATWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA GGDHNSGWGLDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 141	ДНК, кодирующая тяжелую цепь	CAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTG CAGCCTGGCGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGTGCCGCT CCGGCTTACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGGT CCGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTC CGGCCTGGGCCACGTGGGCTACACCACCTACACCGA CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAA CTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCT GAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG

		AGACTACCTGGACTTCGGCTACTACTTCGACGTGTGG GGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCCGCCTCC ACCAAGGGACCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCA GCAAGTCCACCTCTGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCG TGTCTTGGA ACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTAC TCCCTGTCCTCCGTCTGTGACCGTGCCCTCCAGCTCTC TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACA AGCCCTCCAACACCAAAGTGGACAAGCGGGTGG AAC CCAAGTCCTGCGGCTCTGGCGGAGGCGGAAGTGGTG GCGGAGGATCAGGCGGCGGAGAAGTGCAGCTGGTC GAGAGTGGCGGAGGCCTCGTCCAGCCAGGCGGATCC CTGAGGCTCAGCTGCACCGCCTCTGGCTTCTCCCTGA CCGACTACTACTATATGACTTGGGTCCGCCAGGCTCC CGGAAAAGGACTCGAATGGGTCTGGATTCATCGACCC CGACGACGACCCCTACTACGCCACCTGGGCCAAGGG CAGATTCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACAC ACTCTATCTCCAGATGAACTCCCTGAGGGCTGAAGA TACCGCTGTCTATTACTGCGCTGGCGGCGACCACAA CTCCGGCTGGGGCCTGGATATCTGGGGACAGGGCAC ACTCGTGACAGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCC CTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCTACC TCTGGCGGCACCGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAG GACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGA ACT CTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGC CGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCTCC GTGGTGACAGTGCCTTCCCTCCAGCCTGGGCACCCAG ACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAAC ACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCATGC
SEQ ID NO: 58 (комбинированная)	LCDR1 1	SGDKIGKKYVH
SEQ ID NO:	LCDR2 1	DDSDRPS

59 (комбинированная)		
SEQ ID NO: 60 (комбинированная)	LCDR3 1	QAWDMQSVV
SEQ ID NO: 58 (Kabat)	LCDR1 1	SGDKIGKKYVH
SEQ ID NO: 59 (Kabat)	LCDR2 1	DDSDRPS
SEQ ID NO: 60 (Kabat)	LCDR3 1	QAWDMQSVV
SEQ ID NO: 61 (Chothia)	LCDR1 1	DKIGKKY
SEQ ID NO: 62 (Chothia)	LCDR2 1	DDS
SEQ ID NO: 63 (Chothia)	LCDR3 1	WDMQSV
SEQ ID NO: 64 (IMGT)	LCDR1 1	KIGKKY
SEQ ID NO: 62 (IMGT)	LCDR2 1	DDS
SEQ ID NO: 60 (IMGT)	LCDR3 1	QAWDMQSVV
SEQ ID NO: 65	VL 1	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDKIGKKYVHWYQQ KPGQAPVLVIYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRA QAGDEADYYCQAWDMQSVVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 142	ДНК, кодирующая VL 1	TCCTACGAGCTGACCCAGCCCCTGTCCGTGTCTGTGG CTCTGGGCCAGACCCGCCGATCACCTGTTCCGGCG ACAAGATCGGCAAGAAATACGTGCACTGGTATCAGC AGAAGCCCGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTACG ACGACTCCGACCGGCCCTCCGGCATCCCTGAGCGGT TCTCCGGCTCCAACCTCCGGCAACACCGCCACCCTGA

		CCATCTCCAGAGCCCAGGCCGGCGACGAGGCCGACT ACTACTGCCAGGCCTGGGACATGCAGTCCGTGGTGT TCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 105 (комбинированная)	LCDR1 2	QASEIHSWLA
SEQ ID NO: 106 (комбинированная)	LCDR2 2	LASTLAS
SEQ ID NO: 107 (комбинированная)	LCDR3 2	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 105 (Kabat)	LCDR1 2	QASEIHSWLA
SEQ ID NO: 106 (Kabat)	LCDR2 2	LASTLAS
SEQ ID NO: 107 (Kabat)	LCDR3 2	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 108 (Chothia)	LCDR1 2	SEIHSW
SEQ ID NO: 109 (Chothia)	LCDR2 2	LAS
SEQ ID NO: 110 (Chothia)	LCDR3 2	VYLASTNGA
SEQ ID NO: 111 (IMGT)	LCDR1 2	EIHSW
SEQ ID NO: 109 (IMGT)	LCDR2 2	LAS

SEQ ID NO: 107 (IMGT)	LCDR3 2	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 112	VL 2	EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQK PGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQ PDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLK
SEQ ID NO: 143	ДНК, кодирующая VL 2	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCTTCCACCCTGTCCG CCTCCGTGGGCGACAGAGTGATCATCACCTGTCAGG CCTCCGAGATCATCCACAGCTGGCTGGCTTGGTATCA GCAGAAACCTGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTA CCTGGCCTCCACCCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGA TTCTCCGGATCTGGCTCTGGCGCCGAGTTCACCCTGA CAATCAGCTCCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCT ACTACTGTCAGAACGTGTACCTGGCCAGCACCAACG GCGCCAACCTTCGGCCAGGGCACAAAACCTGACAGTGC TGAAG
SEQ ID NO: 118	LC-линкер	GSGGGGSGGGGSGGG
SEQ ID NO: 144	ДНК, кодирующая LC-линкер	GGCTCTGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTTCT GGCGGCGGA
SEQ ID NO: 145	Легкая цепь	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDKIGKKYVHWYQQ KPGQAPVLVIYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRA QAGDEADYYCQAWDMQSVVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSGSGGGGSGGGGSG GGEIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQ QKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTIS LQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 146	ДНК, кодирующая легкую цепь	TCCTACGAGCTGACCCAGCCCCTGTCCGTGTCTGTGG CTCTGGGCCAGACCGCCCGGATCACCTGTTCCGGCG ACAAGATCGGCAAGAAATACGTGCACTGGTATCAGC

		<p> AGAAGCCCGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTACG ACGACTCCGACCGGCCCTCCGGCATCCCTGAGCGGT TCTCCGGCTCCA ACTCCGGCAACACCGCCACCCTGA CCATCTCCAGAGCCCAGGCCGGCGACGAGGCCGACT ACTACTGCCAGGCCTGGGACATGCAGTCCGTGGTGT TCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGCCAGC CCAAGGCCGCTCCCTCTGTGACCCTGTTCCCTCCATC CTCCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTCGT GTGCCTGATCTCCGACTTCTACCCTGGCGCCGTGACC GTGGCCTGGAAGGCCGACAGCTCTCCTGTGAAGGCC GGCGTGGA AACCACCACCCCTTCCAAGCAGTCCAAC AACAAATACGCCGCCTCCTCCTACCTGTCCCTGACCC CTGAGCAGTGGAAGTCCCACCGGTCCTACAGCTGCC AAGTCACACACGAGGGCTCCACCGTGGA AAGACCG TGGCCCCTACCGAGTGCTCCGGCTCTGGTGGCGGAG GATCTGGCGGAGGCGGTTCTGGCGGCGGAGAGATCG TGATGACCCAGTCCCCTTCCACCCTGTCCGCCTCCGT GGGCGACAGAGTGATCATCACCTGTCAGGCCTCCGA GATCATCCACAGCTGGCTGGCTTGGTATCAGCAGAA ACCTGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACCTGGC CTCCACCCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGATTCTCC GGATCTGGCTCTGGCGCCGAGTTCACCCTGACAATC AGCTCCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACT GTCAGAACGTGTACCTGGCCAGCACCAACGGCGCCA ACTTCGGCCAGGGCACAAA ACTGACAGTGCTGAAGC GTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTT CATCTTCCCCC CAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCG TGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCCGGGAGG CCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGA GCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTG ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTG TACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGC CCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC </p>
NVS14		

SEQ ID NO: 69 (комбинированная)	HCDR1 1	GFTFSRYWIS
SEQ ID NO: 70 (комбинированная)	HCDR2 1	YIDSTGTFINYADSVKG
SEQ ID NO: 71 (комбинированная)	HCDR3 1	GGSLFDY
SEQ ID NO: 72 (Kabat)	HCDR1 1	RYWIS
SEQ ID NO: 70 (Kabat)	HCDR2 1	YIDSTGTFINYADSVKG
SEQ ID NO: 71 (Kabat)	HCDR3 1	GGSLFDY
SEQ ID NO: 73 (Chothia)	HCDR1 1	GFTFSRY
SEQ ID NO: 74 (Chothia)	HCDR2 1	DSTGTF
SEQ ID NO: 71 (Chothia)	HCDR3 1	GGSLFDY
SEQ ID NO: 75 (IMGT)	HCDR1 1	GFTFSRYW
SEQ ID NO: 76 (IMGT)	HCDR2 1	IDSTGTFI
SEQ ID NO: 77 (IMGT)	HCDR3 1	ARGGSLFDY
SEQ ID NO: 78	VH 1	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVR QAPGKGLEWVSYIDSTGTFINYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSLFDYWGQGLV TVSS

SEQ ID NO: 147	ДНК, кодирующая VH 1	CAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTG CAGCCTGGCGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGTGCCGCCT CCGGCTTCACCTTCTCCCAGGACTGGATCTCCTGGGT CCGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTC CTACATCGACTCCACCGGCACCTTCATCAACTACGCC GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGAC AACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCC CTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGAGGCGGCAGCCTGTTCGACTACTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTGTCTCC
SEQ ID NO: 92 (комбинированная)	HCDR1 2	GFSLTDYYMT
SEQ ID NO: 93 (комбинированная)	HCDR2 2	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 94 (комбинированная)	HCDR3 2	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 95 (Kabat)	HCDR1 2	DYYMT
SEQ ID NO: 93 (Kabat)	HCDR2 2	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 94 (Kabat)	HCDR3 2	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 96 (Chothia)	HCDR1 2	GFSLTDYY
SEQ ID NO: 97 (Chothia)	HCDR2 2	DPDDD
SEQ ID NO: 94 (Chothia)	HCDR3 2	GDHNSGWGLDI

SEQ ID NO: 98 (IMGT)	HCDR1 2	GFSLTDYYY
SEQ ID NO: 99 (IMGT)	HCDR2 2	IDPDDDP
SEQ ID NO: 100 (IMGT)	HCDR3 2	AGGDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 101	VH 2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTW VRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIW GQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 148	ДНК, кодирующая VH 2	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGTGGCGGAGGCCTCGTC CAGCCAGGCGGATCCCTGAGGCTCAGCTGCACCGCC TCTGGCTTCTCCCTGACCGACTACTACTACATGACAT GGGTCCGCCAGGCTCCCGGAAAAGGACTCGAATGGG TCGGATTCATCGACCCCGACGACGCCCTACTACG CCACCTGGGCCAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAG ATAACAGCAAGAACAACACTCTATCTCCAGATGAACT CCCTGAGGGCTGAAGATACCGCTGTCTATTACTGCG CTGGCGGCGACCACAACCTCCGGCTGGGGCCTGGATA TCTGGGGACAGGGAACACTCGTGACAGTGTCCAGC
SEQ ID NO: 118	НС-линкер	GSGGGGSGGGGSGGG
SEQ ID NO: 139	ДНК, кодирующая НС-линкер	GGCTCTGGCGGAGGCGGAAGTGGTGGCGGAGGATC AGGCGGCGGA
SEQ ID NO: 149	Тяжелая цепь	QVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGF TFSRYWISWVR QAPGKGLEWVSYIDSTGTFINYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSLFDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCGSGGGGSG GGGSGGGEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCTASGFSLTD YYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNS

		<p>GWGLDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSC</p>
<p>SEQ ID NO: 150</p>	<p>ДНК, кодирующая тяжелую цепь</p>	<p>CAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTG CAGCCTGGCGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGTGCCGCCT CCGGCTTCACCTTCTCCCAGTACTGGATCTCCTGGGT CCGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTC CTACATCGACTCCACCGGCACCTTCATCAACTACGCC GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGAC AACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCC CTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGAGGCGGCAGCCTGTTCGACTACTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGA CCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCCA CCTCTGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGA ACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCC TGCCGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC TCCGTCGTGACCGTGCCTCCAGCTCTCTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCA ACACCAAAGTGGACAAGCGGGTGGAAACCAAGTCCT GCGGCTCTGGCGGAGGGCGGAAGTGGTGGCGGAGGA TCAGGCGGCGGAGAAGTGCAGCTGGTCGAGAGTGGC GGAGGCCTCGTCCAGCCAGGCGGATCCCTGAGGCTC AGCTGCACCGCCTCTGGCTTCTCCCTGACCGACTACT ACTACATGACATGGGTCCGCCAGGCTCCCGGAAAAG GACTCGAATGGGTTCGGATTCATCGACCCCGACGACG ACCCCTACTACGCCACCTGGGCCAAGGGCAGATTCA CCATCTCCAGAGATAACAGCAAGAACACACTCTATC TCCAGATGAACTCCCTGAGGGCTGAAGATACCGCTG TCTATTACTGCGCTGGCGGCGACCACAACCTCCGGCT GGGGCCTGGATATCTGGGGACAGGGAACACTCGTGA CAGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGT TCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGG</p>

		CACCGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTC CCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGCGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGC AGTCCTCCGGCCTGTAAGTCCCTGTCTCCGTGGTGAC AGTGCCTTCCCTCCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATC TGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTG GACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCATGC
SEQ ID NO: 82 (комбинированная)	LCDR1 1	RASQGIISYLG
SEQ ID NO: 83 (комбинированная)	LCDR2 1	AASSLQS
SEQ ID NO: 84 (комбинированная)	LCDR3 1	QQYDALNT
SEQ ID NO: 82 (Kabat)	LCDR1 1	RASQGIISYLG
SEQ ID NO: 83 (Kabat)	LCDR2 1	AASSLQS
SEQ ID NO: 84 (Kabat)	LCDR3 1	QQYDALNT
SEQ ID NO: 85 (Chothia)	LCDR1 1	SQGIISY
SEQ ID NO: 18 (Chothia)	LCDR2 1	AAS
SEQ ID NO: 86 (Chothia)	LCDR3 1	YDALN
SEQ ID NO: 87 (IMGT)	LCDR1 1	QGIISY
SEQ ID NO:	LCDR2 1	AAS

18 (IMGT)		
SEQ ID NO: 84 (IMGT)	LCDR3 1	QQYDALNT
SEQ ID NO: 88	VL 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISYLGWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQ PEDFATYYCQQYDALNTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 151	ДНК, кодирующая VL 1	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCAGCCTGTCC GCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCG GCCTCCCAGGGCATCATCTCCTACCTGGGCTGGTATC AGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCT ACGCCGCCAGCTCCCTGCAGTCCGGCGTGCCCTCCA GATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCAC CTACTACTGCCAGCAGTACGACGCCCTGAACACCTT CGGCCAGGGCACCAAAGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 105 (комбинированная)	LCDR1 2	QASEIHSWLA
SEQ ID NO: 106 (комбинированная)	LCDR2 2	LASTLAS
SEQ ID NO: 107 (комбинированная)	LCDR3 2	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 105 (Kabat)	LCDR1 2	QASEIHSWLA
SEQ ID NO: 106 (Kabat)	LCDR2 2	LASTLAS
SEQ ID NO: 107 (Kabat)	LCDR3 2	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO:	LCDR1 2	SEIHSW

108 (Chothia)		
SEQ ID NO: 109 (Chothia)	LCDR2 2	LAS
SEQ ID NO: 110 (Chothia)	LCDR3 2	VYLASTNGA
SEQ ID NO: 111 (IMGT)	LCDR1 2	EIIHSW
SEQ ID NO: 109 (IMGT)	LCDR2 2	LAS
SEQ ID NO: 107 (IMGT)	LCDR3 2	QNVYLASTNGAN
SEQ ID NO: 112	VL 2	EIVMTQSPSTLSASVGD RVIITCQASEIIHSWLAWYQQK PGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQ PDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLK
SEQ ID NO: 152	ДНК, кодирующая VL 2	GAGATCGTGATGACCCAGTCCCCTAGCACCTGAGC GCCAGCGTGGGAGATCGCGTGATCATCACATGCCAG GCCTCCGAGATCATCCACAGCTGGCTGGCTTGGTATC AGCAGAAACCTGGAAAAGCTCCCAAGCTCCTGATCT ATCTGGCCAGCACCCCTGGCCTCTGGCGTGCCCAGCA GATTCAGCGGCTCCGGCAGCGGCGCTGAGTTTACCC TGACAATCAGCTCTCTGCAGCCTGACGATTTTGCTAC CTACTATTGTCAGAACGTGTACCTGGCCTCCACCAAC GGCGCCAAC TTTGGCCAGGGAACAAAGCTGACCGTG CTGAAG
SEQ ID NO: 118	LC-линкер	GSGGGGSGGGGSGGG
SEQ ID NO: 153	ДНК, кодирующая LC-линкер	GGCTCCGGCGGAGGCGGATCTGGTGGCGGAGGATCT GGCGGTGGC
SEQ ID NO: 154	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQGIISYLGWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ

		<p>PEDFATYYCQQYDALNTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGSGGGGSGGGGSGGGGEI VMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKP GKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQP DDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>SEQ ID NO: 155</p>	<p>ДНК, кодирующая легкую цепь</p>	<p>GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCAGCCTGTCC GCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCGG GCCTCCCAGGGCATCATCTCCTACCTGGGCTGGTATC AGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCT ACGCCGCCAGCTCCCTGCAGTCCGGCGTGCCCTCCA GATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCAC CTACTACTGCCAGCAGTACGACGCCCTGAACACCTT CGGCCAGGGCACCAAAGTGGAATCAAGCGGACCG TGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCACCCTCCGA CGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTCGTGTG CCTGCTGAACAATTCTACCCTCGCGAGGCCAAAGT GCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCA ACTCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGG ACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTC CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTG CGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGAC CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGTGGCTCCGGCGG AGGCGGATCTGGTGGCGGAGGATCTGGCGGTGGCGA GATCGTGATGACCCAGTCCCCTAGCACCTGAGCGC CAGCGTGGGAGATCGCGTGATCATCATGCCAGGC CTCCGAGATCATCCACAGCTGGCTGGCTTGGTATCA GCAGAAACCTGGAAAAGCTCCCAAGCTCCTGATCTA TCTGGCCAGCACCTGGCCTCTGGCGTGCCCAGCAG ATTCAGCGGCTCCGGCAGCGGCGCTGAGTTTACCCT</p>

		GACAATCAGCTCTCTGCAGCCTGACGATTTTGCTACC TACTATTGTCAGAACGTGTACCTGGCCTCCACCAACG GCGCCAACTTTGGCCAGGGAACAAAGCTGACCGTGC TGAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTT CCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCCGC CAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCG GGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC TGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT AAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTG TCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAG TGC
--	--	---

Линкеры

[439] В определенных аспектах настоящего изобретения связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС может быть связана с молекулой, например связывающей функциональной единицей на основе антитела к VEGF, с помощью линкера. Более конкретно, связывающие функциональные единицы на основе антитела к ВТС могут быть связаны с белком или нуклеиновой кислотой с помощью пептидного линкера (например, линкера $(Gly_n-Ser_n)_n$ или $(Ser_n-Gly_n)_n$) с оптимизированными длиной и/или аминокислотным составом. Известно, что длина пептидного линкера может в большой степени влиять на то, как сворачиваются и взаимодействуют соединенные белки. Примеры ориентации и размера линкеров см. , например, в Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, публикациях заявок на патент США №№ 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 и публикациях согласно РСТ №№ WO 2006/020258 и WO 2007/024715, которые включены в данный документ посредством ссылки.

[440] Последовательность пептидного линкера может составлять по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или более аминокислотных остатков в длину. Последовательность пептидного линкера может состоять из встречающихся или не встречающихся в природе аминокислот. В некоторых аспектах линкер представляет собой глициновый полимер. В некоторых аспектах аминокислоты в последовательности линкера представлены аминокислотами, представляющими собой глицин и серин. В определенных аспектах линкерная область содержит группы глициновых повторов $(GlySerGly_3)_n$, где n представляет собой положительное целое число, которое равняется или больше 1, например n=3 (SEQ ID NO: 118). Более конкретно последовательность линкера может представлять собой GlySerGlyGlyGly (SEQ ID NO: 165). В качестве альтернативы

последовательность линкера может представлять собой GlySerGlyGly (SEQ ID NO: 166). В определенных других аспектах ориентация линкерной области предусматривает группы глициновых повторов (SerGly₃)_n, где n представляет собой положительное целое число, которое равняется или больше 1, например n=3 (SEQ ID NO: 167).

[441] Пептидные линкеры также могут включать без ограничения (Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO: 161) или (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 162). Аминокислотные остатки Glu и Lys могут быть распределены в пределах пептидных линкеров из Gly-Ser для обеспечения лучшей растворимости. В определенных аспектах пептидные линкеры могут содержать несколько повторов (Gly₃Ser), (Gly₂Ser) или (GlySer). В определенных аспектах пептидные линкеры могут содержать несколько повторов (SerGly₃), (SerGly₂) или (SerGly). В других аспектах пептидные линкеры могут включать комбинации и кратные количества (Gly₃Ser) + (Gly₄Ser) + (GlySer) (SEQ ID NO: 163). В еще одних аспектах Ser может быть заменен на Ala, например (Gly₄Ala) или (Gly₃Ala). В еще других аспектах линкер содержит мотив (GluAlaAlaAlaLys)_n (SEQ ID NO: 164), где n представляет собой положительное целое число, которое равняется или больше 1. В определенных аспектах пептидные линкеры также могут включать расщепляемые линкеры.

[442] Длина пептидных линкеров может варьироваться. В частности, пептидный линкер составляет от приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислот в длину; от приблизительно 10 до приблизительно 40 аминокислот в длину; от приблизительно 15 до приблизительно 30 аминокислот в длину или от приблизительно 15 до приблизительно 20 аминокислот в длину. При изменении длины пептидного линкера может сохраняться или усиливаться активность, что приводит к превосходной эффективности в исследованиях активности. Пептидные линкеры можно вводить в последовательности полипептидов и белков с применением методик, известных из уровня техники. Например, можно применять ПЦР-мутагенез. Модификации можно подтверждать посредством анализа последовательности ДНК. Можно применять плазмидную ДНК для трансформирования клеток-хозяев для обеспечения стабильного продуцирования продуцируемых полипептидов.

[443] Пептидные линкеры, связывающие функциональные единицы на основе антитела к ВТС и белки, например связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF, могут быть закодированы в одном и том же векторе и могут экспрессироваться и претерпевать сборку в одной и той же клетке-хозяине. В качестве альтернативы каждый пептидный линкер, связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС, связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF и белок или нуклеиновая кислота могут быть получены по отдельности, а затем конъюгированы друг с другом. Пептидные линкеры, связывающие функциональные единицы на основе антитела к ВТС и белки или нуклеиновые кислоты могут быть получены путем конъюгирования составляющих компонентов с применением способов, известных из уровня техники. Сайт-специфическая конъюгация может быть достигнута с применением опосредованной сортазой ферментативной конъюгации (Mao H, et al., J. Am.

Chem. Soc. 2004 Mar 10;126(9):2670-1). Для ковалентной конъюгации можно применять ряд различных средств для обеспечения реакции сочетания или сшивающих средств. Примеры сшивающих средств включают белок А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетил-тиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см. например, Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Другие способы включают способы, описанные в Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132; Brennan et al., 1985 Science 229:81-83), and Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375). Конъюгирующие средства представляют собой SATA и сульфо-SMCC, оба из них доступны от Pierce Chemical Co. (Рокфорд, Иллинойс).

Форматы и типы мультиспецифических связывающих молекул

[444] В некоторых аспектах мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело или биспецифическую антителоподобную молекулу. В некоторых аспектах биспецифическое антитело или антителоподобная молекула могут являться поливалентными, например бивалентными по отношению к одному антигену и одновалентными по отношению к другому антигену. Иллюстративная молекула биспецифического антитела или биспецифическая антителоподобная молекула характеризуется наличием первого антигенсвязывающего домена (например, содержащего первую тяжелую цепь и первую легкую цепь), который характеризуется специфичностью связывания с первым антигеном или эпитопом (например, ВТС), и второго антигенсвязывающего домена (например, содержащего вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь), который характеризуется специфичностью связывания со вторым антигеном или эпитопом (например, VEGF).

[445] В некоторых аспектах первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В ряде аспектов молекула биспецифического антитела или биспецифическая антителоподобная молекула содержат последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые характеризуются специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу или антигену, и последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые характеризуются специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу или антигену.

[446] В некоторых аспектах молекула биспецифического антитела или антителоподобная молекула содержат полуантитело, характеризующееся специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу или антигену; и полуантитело, характеризующееся специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу или антигену. В одном аспекте молекула биспецифического антитела или антителоподобная молекула содержат полуантитело или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу или антигену; и полуантитело или его

фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу или антигену.

[447] В ряде аспектов молекула биспецифического антитела или биспецифическая антителоподобная молекула содержат scFv или Fab или их фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу или антигену; и антитело или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу или антигену. В ряде аспектов молекула биспецифического антитела или биспецифическая антителоподобная молекула содержат два scFv или Fab или их фрагмента, характеризующиеся специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу или антигену; и антитело или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу или антигену. В ряде аспектов молекула биспецифического антитела или биспецифическая антителоподобная молекула содержат scFv или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу или антигену; и Fab или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу или антигену.

[448] В определенных аспектах антитело или антителоподобная молекула представлены полиспецифическими (например, биспецифическими или триспецифическими) антителом или антителоподобной молекулой. Протоколы получения молекул биспецифических или гетеродимерных антител или антителоподобных молекул известны из уровня техники, включая без ограничения, например, подход "выступ во впадину", как описано, например, в US 5731168; спаривание Fc с использованием направленного электростатического взаимодействия, как описано, например, в WO 09/089004, WO 06/106905 и WO 2010/129304; образование гетеродимеров путем конструирования доменов с обменом нитей (SEED), как описано, например, в WO 07/110205; обмен Fab-фрагментами, как описано, например, в WO 08/119353, WO 2011/131746 и WO 2013/060867; двойные конъюгаты антител, например, получаемые путем сшивания антител с образованием биспецифической структуры с помощью гетеробифункционального реагента, содержащего реакционноспособную аминогруппу и реакционноспособную сульфгидрильную группу, как описано, например, в US 4433059; детерминанты биспецифических антител или антителоподобных молекул, получаемые путем рекомбинации полуантител (пары тяжелая-легкая цепь или Fab) из разных антител или антителоподобных молекул посредством цикла восстановления и окисления дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями, как описано, например, в US 4444878; трифункциональные антитела, например три Fab'-фрагмента, сшитые с помощью реакционноспособных сульфгидрильных групп, как описано, например, в US 5273743; биосинтетические связывающие белки, например пары scFv, сшитых на C-концевых хвостах, предпочтительно посредством химической сшивки с помощью дисульфидных связей или реакционноспособных аминогрупп, как описано, например, в US 5534254; бифункциональные антитела, например Fab-фрагменты с различной специфичностью связывания, димеризованные с помощью лейциновых "застежек" (например, c-fos и c-jun),

заменивших константный домен, как описано, например, в US 5582996; биспецифические и олигоспецифические моно- и олиговалентные рецепторы, например V_H - C_H1 -области (Fd-области) двух антител (два Fab-фрагмента), связанные полипептидным спейсером между C_H1 -областью одного антитела и V_H -областью другого антитела, обычно с ассоциированными легкими цепями, как описано, например, в US 5591828; биспецифические конъюгаты ДНК-антитело, например, получаемые путем сшивки антител или Fab-фрагментов двухнитевым фрагментом ДНК, как описано, например, в US 5635602; биспецифические слитые белки, например экспрессионная конструкция, содержащая два scFv с гидрофильным спиральным пептидным линкером между ними и полную константную область, как описано, например, в US 5637481; поливалентные и мультиспецифические связывающие белки, например димеры полипептидов, имеющие первый домен со связывающей областью вариабельной области тяжелой цепи Ig и второй домен со связывающей областью вариабельной области легкой цепи Ig, как правило, называемые диателами (также охватываются структуры более высокого порядка для создания биспецифических, триспецифических или тетраспецифических молекул, как описано, например, в US 5837242; конструкции миниантител со связанными V_L - и V_H -цепями, дополнительно соединенными пептидными спейсерами с шарнирной областью и C_H3 -областью антитела, которые могут быть димеризованы с образованием биспецифических/поливалентных молекул, как описано, например, в US 5837821; V_H - и V_L -домены, связанные коротким пептидным линкером (например, из 5 или 10 аминокислот) или вовсе не имеющие линкера, расположенные в любой ориентации, которые могут образовывать димеры с образованием биспецифических диател; тримеры и тетрамеры, как описано, например, в US 5844094; нить из V_H -доменов (или V_L -доменов у представителей семейства), соединенных пептидными связями со сшиваемыми группами на С-конце, дополнительно ассоциированных с V_L -доменами с образованием последовательно соединенных Fv (или scFv), как описано, например, в US 5864019; V_L - и V_H -домены, scFv или Fab, где один из антигенов связывается моновалентно и один из антигенов связывается бивалентно, необязательно содержащие гетеродимерные Fc-области, как описано, например, в WO 2011/028952; и одноцепочечные связывающие полипептиды как с V_L -, так и с V_H -доменами, связанными пептидным линкером, объединенные в поливалентные структуры посредством нековалентной или химической сшивки с образованием, например, гомобивалентных, гетеробивалентных, тривалентных и тетравалентных структур с использованием формата как типа scFv, так и типа диатела, как описано, например, в US 5869620.

[449] Дополнительные иллюстративные мультиспецифические и биспецифические молекулы и способы их получения можно найти, например, в US 5910573, US 5932448, US 5959083, US 5989830, US 6005079, US 6239259, US 6294353, US 6333396, US 6476198, US 6511663, US 6670453, US 6743896, US 6809185, US 6833441, US 7129330, US 7183076, US 7521056, US 7527787, US 7534866, US 7612181, US 2002004587A1, US 2002076406A1, US 2002103345A1, US 2003207346A1, US 2003211078A1, US 2004219643A1, US

2004220388A1, US 2004242847A1, US 2005003403A1, US 2005004352A1, US
 2005069552A1, US 2005079170A1, US 2005100543A1, US 2005136049A1, US
 2005136051A1, US 2005163782A1, US 2005266425A1, US 2006083747A1, US
 2006120960A1, US 2006204493A1, US 2006263367A1, US 2007004909A1, US
 2007087381A1, US 2007128150A1, US 2007141049A1, US 2007154901A1, US
 2007274985A1, US 2008050370A1, US 2008069820A1, US 2008152645A1, US
 2008171855A1, US 2008241884A1, US 2008254512A1, US 2008260738A1, US
 2009130106A1, US 2009148905A1, US 2009155275A1, US 2009162359A1, US
 2009162360A1, US 2009175851A1, US 2009175867A1, US 2009232811A1, US
 2009234105A1, US 2009263392A1, US 2009274649A1, EP 346087A2, WO 0006605A2, WO
 02072635A2, WO 04081051A1, WO 06020258A2, WO 2007044887A2, WO 2007095338A2,
 WO 2007137760A2, WO 2008119353A1, WO 2009021754A2, WO 2009068630A1, WO
 9103493A1, WO 9323537A1, WO 9409131A1, WO 9412625A2, WO 9509917A1, WO
 9637621A2, WO 9964460A1. Содержание вышеупомянутых заявок включено в данный
 документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[450] Соответственно, в некоторых аспектах мультиспецифические связывающие ВТС/VEGF молекулы по настоящему изобретению содержат домен, связывающий ВТС, и домен, связывающий VEGF, в любом из мультиспецифических или биспецифических форматов, известных из уровня техники и описанных на всем протяжении данного документа. Предпочтительные форматы для мультиспецифических связывающих молекул по настоящему изобретению более подробно описаны ниже.

[451] Мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, где связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС содержит переменный домен тяжелой цепи (VHA) и переменный домен легкой цепи (VLA), которые связываются с ВТС, и где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит переменный домен тяжелой цепи (VHB) и переменный домен легкой цепи (VLB), которые связываются с VEGF. В одном аспекте VHA и VLA связаны посредством ковалентной связи, например дисульфидной связи. В одном аспекте VHB и VLB связаны посредством ковалентной связи, например дисульфидной связи. В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представлена в формате от N-конца до C-конца следующим образом: N-VHA-линкер-1-VHB-C и N-VLA-линкер-2-VLB-C. В другом аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представлена в формате от N-конца до C-конца следующим образом: N-VHB-линкер-1-VHA-C и N-VLB-линкер-2-VLA-C. Линкер 1 и линкер 2 могут быть одинаковыми или разными.

[452] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1A) и константный домен легкой цепи (СКА), и где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1B) и

константный домен легкой цепи (СКВ). В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представлена в формате от N-конца до С-конца следующим образом: N-VHA-CH1A-линкер-VHB-CH1B-C и N-VLA-СКА-линкер-VLB-СКВ-С, например, NVS11, NVS12, NVS13 и NVS14, представленные в таблице 3. В другом аспекте мультиспецифическая связывающая молекула представлена в формате от N-конца до С-конца: N-VHB-CH1B-линкер-VHA-CH1A-C и N-VLB-СКВ-линкер-VLA-СКА-С. В одном аспекте два линкера являются одинаковыми. В другом аспекте два линкера являются разными.

[453] В определенных аспектах вместе с VH присутствует константная область CH1 и вместе с VL присутствует константная область Cκ, вследствие чего образуется Fab-фрагмент путем димеризации соответствующих легких и тяжелых цепей (т. е. VHA-CH1 будет образовывать Fab-фрагмент с VLA-Cκ, и VHB-CH1 будет образовывать Fab-фрагмент с VLB-Cκ). В определенных аспектах мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению находится в формате Fab-Fab, в котором обе из связывающей функциональной единицы на основе антитела к BTC и связывающей функциональной единицы на основе антитела к VEGF образуют Fab-фрагменты. В другом аспекте константная область CH1 присутствует вместе с VH и константная область Cλ присутствует вместе с VL, вследствие чего образуется Fab-фрагмент путем димеризации соответствующих легких и тяжелых цепей (т. е. VHA-CH1 будет образовывать Fab-фрагмент с VLA-Cλ, и VHB-CH1 будет образовывать Fab-фрагмент с VLB-Cλ).

[454] Мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC представляет собой Fab и содержит тяжелую цепь (HA) и легкую цепь (LA), и где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF, представляет собой Fab и содержит тяжелую цепь (HB) и легкую цепь (LB). В одном аспекте HA и HB связаны в формате от N-конца к С-концу: N-HA-линкер-1-HB-C, и при этом LA и LB связаны в формате от N-конца к С-концу: N-LA-линкер-2-LB-C. В другом аспекте HA и HB связаны в формате от N-конца к С-концу: N-HB-линкер-1-HA-C, и где LA и LB связаны в формате, от N-конца к С-концу: N-LB-линкер-2-LA-C. Линкер 1 и линкер 2 могут быть одинаковыми или разными. В одном аспекте линкер 1 и линкер 2 содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 118 или кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 119. В другом аспекте линкер 1 и линкер 2 содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 161-167.

[455] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула Fab по настоящему изобретению характеризуется структурой, изображенной на фиг. 1-2.

[456] В одном аспекте биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит две полипептидные цепи: одну цепь, содержащую scFv к VEGF и вариабельный домен легкой цепи антитела к BTC (VLB), при этом также содержащую константную

область легкой цепи CL (VLB-CL), связанные вместе посредством линкерного пептида, и другую цепь, содержащую переменный домен тяжелой цепи антитела к ВТС (VHB), также содержащую константную область CH1 тяжелой цепи (VHB-CH1). В другом аспекте биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит две полипептидные цепи: одну цепь, содержащую scFv к VEGF и переменный домен тяжелой цепи антитела к ВТС (VHB), также содержащую константную область CH1 тяжелой цепи (VHB-CH1), связанные вместе посредством линкерного пептида, и другую цепь, содержащую переменный домен легкой цепи антитела к ВТС (VLB), также содержащую константную область CL легкой цепи (VLB-CL).

[457] В определенных аспектах ориентация scFv на одной полипептидной цепи биспецифического антитела по настоящему изобретению может представлять собой NH₂-VLB-CL-линкер-2-scFv-COOH или NH₂-VHB-CH1-линкер-2-scFv-COOH. В одном аспекте последовательность линкера между VL- и VH-доменами в scFv характеризуется последовательностью (GGGS)₄ (SEQ ID NO: 63), при этом VL и VH находятся в формате NH₂-VLA-линкер-2-VHA-COOH.

[458] В других аспектах один из связывающих доменов биспецифического антитела по настоящему изобретению образует Fab, а другой связывающий домен образует одноцепочечный фрагмент антитела (scFv). Специалист в данной области техники поймет, что в дополнение к показанным возможны другие ориентации. Например, возможен формат scFv-Fab, или могут быть подвергнуты реаранжировке специфичности связывания.

[459] В некоторых аспектах мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело или биспецифическую антителоподобную молекулу. В другом аспекте в настоящем изобретении описаны мультиспецифические молекулы, содержащие домен со специфичностью по отношению к ВТС (т. е. функциональную единицу на основе антитела к ВТС) и другой домен со специфичностью по отношению к другой терапевтической мишени (функциональную единицу, связывающую терапевтическую мишень), например VEGF. Например, мультиспецифическая молекула может содержать связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Антитела к ВТС известны из уровня техники, например, как описано в US 6183971 и WO 2004/083241 A2.

[460] Антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент можно дериватизировать или связывать с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом рецептора) с получением биспецифической молекулы, которая связывается с по меньшей мере двумя разными связывающими сайтами или молекулами-мишенями. Антитело по настоящему изобретению, фактически, можно дериватизировать или связывать с более чем одной другой функциональной молекулой с получением мультиспецифических молекул, которые связываются с более чем двумя разными сайтами связывания и/или

молекулами-мишенями; причем предполагается, что такие мультиспецифические молекулы также охватываются используемым в данном документе термином "биспецифическая молекула". Для создания биспецифической молекулы по настоящему изобретению антитело по настоящему изобретению можно функционально связывать (например, посредством химической реакции сочетания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, антигенсвязывающий фрагмент, пептид или связывающий миметик, в результате чего получают биспецифическую молекулу.

[461] Соответственно, настоящее изобретение включает биспецифические молекулы, содержащие по меньшей мере один первый элемент, обеспечивающий специфичность связывания по отношению к ВТС, и второй элемент, обеспечивающий специфичность связывания по отношению ко второму эпитопу-мишени, например другой терапевтической мишени. Например, второй эпитоп-мишень представляет собой эпитоп VEGF.

[462] В одном аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС и связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF, содержащиеся в мультиспецифической связывающей молекуле, находятся в формате, включающем, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv (scFv). В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС представляет собой Fab к ВТС, и связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой Fab к VEGF. В другом аспекте связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС представляет собой scFv, и связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF, представляет собой scFv. Связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС и связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF, содержащиеся в мультиспецифической связывающей молекуле, также могут представлять собой димер на основе легких цепей или тяжелых цепей или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv, или одноцепочечную конструкцию, описанную в патенте США № 4946778 Ladner et al..

[463] В одном аспекте мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению может представлять собой диатело. Диатела представляют собой бивалентные биспецифические молекулы, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, соединенные линкером, который является слишком коротким для того, чтобы обеспечить возможность спаривания между двумя доменами на одной и той же цепи. VH- и VL-домены спариваются с комплементарными доменами другой цепи, создавая таким образом два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al., 1994 Structure 2:1121-1123). Диатела можно получать посредством экспрессии двух полипептидных цепей либо со структурой VHA-VLB и VHB-VLA (конфигурация VH-VL), либо VLA-VHB и VLB-VHA (конфигурация VL-VH) в

одной и той же клетке. Большинство из них могут экспрессироваться в растворимой форме в бактериях. Одноцепочечные диатела (scDb) получают путем соединения двух образующих диатело полипептидных цепей с линкером из примерно 15 аминокислотных остатков (см. Holliger and Winter, 1997 *Cancer Immunol. Immunother.*, 45(3-4):128-30; Wu et al., 1996 *Immunotechnology*, 2(1):21-36). scDb могут экспрессироваться в бактериях в растворимой активной мономерной форме (см. Holliger and Winter, 1997 *Cancer Immunol. Immunother.*, 45(34): 128-30; Wu et al., 1996 *Immunotechnology*, 2(1):21-36; Pluckthun and Pack, 1997 *Immunotechnology*, 3(2): 83-105; Ridgway et al., 1996 *Protein Eng.*, 9(7):617-21). Диатело можно сливать с Fc с получением "ди-диатела" (см. Lu et al., 2004 *J. Biol. Chem.*, 279(4):2856-65). Другие антитела, которые могут применяться в биспецифических молекулах по настоящему изобретению, представляют собой мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

[464] Протоколы получения молекул биспецифических или гетеродимерных антител или антителоподобных молекул известны из уровня техники, включая без ограничения, например, подход "выступ во впадину", как описано, например, в US 5731168; спаривание Fc с использованием направленного электростатического взаимодействия, как описано, например, в WO 09/089004, WO 06/106905 и WO 2010/129304; образование гетеродимеров путем конструирования доменов с обменом нитей (SEED), как описано, например, в WO 07/110205; обмен Fab-фрагментами, как описано, например, в WO 08/119353, WO 2011/131746 и WO 2013/060867; двойные конъюгаты антител, например, получаемые путем сшивания антител с образованием биспецифической структуры с помощью гетеробифункционального реагента, содержащего реакционноспособную аминогруппу и реакционноспособную сульфгидрильную группу, как описано, например, в US 4433059; детерминанты биспецифических антител или антителоподобных молекул, получаемые путем рекомбинации полуантител (пары тяжелая-легкая цепь или Fab) из разных антител или антителоподобных молекул посредством цикла восстановления и окисления дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями, как описано, например, в US 4444878; трифункциональные антитела, например три Fab'-фрагмента, сшитые с помощью реакционноспособных сульфгидрильных групп, как описано, например, в US 5273743; биосинтетические связывающие белки, например пары scFv, сшитых на C-концевых хвостах, предпочтительно посредством химической сшивки с помощью дисульфидных связей или реакционноспособных аминогрупп, как описано, например, в US 5534254; бифункциональные антитела, например Fab-фрагменты с различной специфичностью связывания, димеризованные с помощью лейциновых "застежек" (например, c-fos и c-jun), заменивших константный домен, как описано, например, в US 5582996; биспецифические и олигоспецифические моно- и олиговалентные рецепторы, например VH-CH1-области (Fd-области) двух антител (два Fab-фрагмента), связанные полипептидным спейсером между CH1-областью одного антитела и VH-областью другого антитела, обычно с ассоциированными легкими цепями, как описано, например, в US 5591828;

биспецифические конъюгаты ДНК-антитело, например, получаемые путем сшивки антител или Fab-фрагментов двухнитевым фрагментом ДНК, как описано, например, в US 5635602; биспецифические слитые белки, например экспрессионная конструкция, содержащая два scFv с гидрофильным спиральным пептидным линкером между ними и полную константную область, как описано, например, в US 5637481; поливалентные и мультиспецифические связывающие белки, например димеры полипептидов, имеющие первый домен со связывающей областью варибельной области тяжелой цепи Ig и второй домен со связывающей областью варибельной области легкой цепи Ig, как правило, называемые диателами (также охватываются структуры более высокого порядка для создания биспецифических, триспецифических или тетраспецифических молекул, как описано, например, в US 5837242; конструкции миниантител со связанными VL- и VH-цепями, дополнительно соединенными пептидными спейсерами с шарнирной областью и СНЗ-областью антитела, которые могут быть димеризованы с образованием биспецифических/поливалентных молекул, как описано, например, в US 5837821; VH- и VL-домены, связанные коротким пептидным линкером (например, из 5 или 10 аминокислот) или вовсе не имеющие линкера, расположенные в любой ориентации, которые могут образовывать димеры с образованием биспецифических диател; тримеры и тетрамеры, как описано, например, в US 5844094; нить из VH-доменов (или VL-доменов у представителей семейства), соединенных пептидными связями со сшиваемыми группами на С-конце, дополнительно ассоциированных с VL-доменами с образованием последовательно соединенных Fv (или scFv), как описано, например, в US 5864019; VL- и VH-домены, scFv или Fab, где один из антигенов связывается моновалентно и один из антигенов связывается бивалентно, необязательно содержащие гетеродимерные Fc-области, как описано, например, в WO 2011/028952; и одноцепочечные связывающие полипептиды как с VL-, так и с VH-доменами, связанными пептидным линкером, объединенные в поливалентные структуры посредством нековалентной или химической сшивки с образованием, например, гомобивалентных, гетеробивалентных, тривалентных и тетравалентных структур с использованием формата как типа scFv, так и типа диатела, как описано, например, в US 5869620.

[465] Дополнительные иллюстративные мультиспецифические и биспецифические молекулы и способы их получения можно найти, например, в US 5910573, US 5932448, US 5959083, US 5989830, US 6005079, US 6239259, US 6294353, US 6333396, US 6476198, US 6511663, US 6670453, US 6743896, US 6809185, US 6833441, US 7129330, US 7183076, US 7521056, US 7527787, US 7534866, US 7612181, US 2002004587A1, US 2002076406A1, US 2002103345A1, US 2003207346A1, US 2003211078A1, US 2004219643A1, US 2004220388A1, US 2004242847A1, US 2005003403A1, US 2005004352A1, US 2005069552A1, US 2005079170A1, US 2005100543A1, US 2005136049A1, US 2005136051A1, US 2005163782A1, US 2005266425A1, US 2006083747A1, US 2006120960A1, US 2006204493A1, US 2006263367A1, US 2007004909A1, US 2007087381A1, US 2007128150A1, US 2007141049A1, US 2007154901A1, US

2007274985A1, US 2008050370A1, US 2008069820A1, US 2008152645A1, US
 2008171855A1, US 2008241884A1, US 2008254512A1, US 2008260738A1, US
 2009130106A1, US 2009148905A1, US 2009155275A1, US 2009162359A1, US
 2009162360A1, US 2009175851A1, US 2009175867A1, US 2009232811A1, US
 2009234105A1, US 2009263392A1, US 2009274649A1, EP 346087A2, WO 0006605A2, WO
 02072635A2, WO 04081051A1, WO 06020258A2, WO 2007044887A2, WO 2007095338A2,
 WO 2007137760A2, WO 2008119353A1, WO 2009021754A2, WO 2009068630A1, WO
 9103493A1, WO 9323537A1, WO 9409131A1, WO 9412625A2, WO 9509917A1, WO
 9637621A2, WO 9964460A1. Содержание вышеупомянутых заявок включено в данный
 документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[466] Биспецифические молекулы можно получить посредством конъюгирования составляющих элементов, обеспечивающих специфичность связывания, с помощью способов, известных в данной области техники. Например, каждый элемент, обеспечивающий специфичность связывания, в биспецифической молекуле можно получить отдельно, а затем конъюгировать друг с другом.

[467] Если элементы, обеспечивающие специфичность связывания, представляют собой антитела, их можно конъюгировать путем связывания посредством сульфгидрильной группы С-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. В конкретном аспекте шарнирная область модифицируется таким образом, чтобы она содержала нечетное количество остатков с сульфгидрильной группой, например один, перед конъюгацией. В качестве альтернативы оба элемента, обеспечивающие специфичность связывания, могут быть закодированы в одном векторе и могут экспрессироваться и собираться в одной клетке-хозяине. Данный способ является особенно применимым, когда биспецифическая молекула представляет собой mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂, лиганд x Fab, антитело к ВТС или его функциональный фрагмент x mAb, формат Crossmab, формат ВІТЕ, антитело к ВТС или его функциональный фрагмент x слитый с Fab белок. Биспецифическая молекула по настоящему изобретению может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одно одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, содержащую две связывающие детерминанты. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патенте США № 5260203; патенте США № 5455030; патенте США № 4881175; патенте США № 5132405; патенте США № 5091513; патенте США № 5476786; патенте США № 5013653; патенте США № 5258498 и патенте США № 5482858.

[468] Связывание мультиспецифических связывающих или поливалентных молекул со своими специфическими мишенями можно подтвердить, например, посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммунологического анализа (REA), FACS-анализа, биологического анализа (например, подавления роста) или вестерн-блот-анализа. В каждом из этих анализов

обычно выявляют наличие комплексов белок-антитело, представляющих особый интерес, путем использования меченого реагента (например, антитела), специфичного в отношении комплекса, представляющего интерес.

[469] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены поливалентные молекулы, содержащие по меньшей мере две идентичные или различающиеся антигенсвязывающие части антител по настоящему изобретению, связывающихся с мишенью, такой как ВТС. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении представлены поливалентные соединения, содержащие по меньшей мере две идентичные или различающиеся антигенсвязывающие части функциональных единиц, связывающих ВТС, и/или функциональных единиц, связывающих терапевтическую мишень. Антигенсвязывающие части могут быть связаны вместе путем слияния белков или создания ковалентной или нековалентной связи. В качестве альтернативы способы связывания были описаны для мультиспецифических молекул. Тетравалентные соединения можно получить, например, путем сшивания антител из антител по настоящему изобретению с антителом, которое связывается с константными областями антител по настоящему изобретению, например, Fc или шарнирной областью.

Модификация молекул по настоящему изобретению

[470] В настоящую заявку включены варианты молекул, описанных в данном документе, и/или их фрагменты, содержащие различные модификации в переменных областях и/или константных областях, а также продукты слияния и конъюгаты раскрытых молекул. Например, Fc-область раскрытых мультиспецифических связывающих молекул, например CH1 и/или C κ , может быть дикого типа, или она может быть модифицирована с получением разных результатов. Предпочтительные модификации Fc включают мутацию "LS" (M428L, N434S, (нумерация EU)) и мутацию "YTE" (M252Y, S254T, T256E (нумерация EU)) для удлинения периода полувыведения, мутацию "DAPA" (D265A, R329A (нумерация EU)) для обеспечения подавления эффектора и мутации типа выступ во впадину (например, выступ S354C, T366W; впадина Y349C, T366S, L368A, Y407V (нумерация EU)), которые способствуют правильному спариванию цепей.

[471] Fc-участки также могут быть модифицированы для "подавления" эффекторной функции, например, для снижения или устранения способности связывающей ВТС молекулы опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Это может быть достигнуто, например, путем введения мутации в Fc-участок. Такие мутации были описаны в уровне техники: LALA и N297A (Strohl, 2009, Curr. Opin. Biotechnol. 20(6):685-691), а также D265A (Baudino et al, 2008, J. Immunol. 181: 6664-69; Strohl, выше). Примеры антител IgG1 с подавленной активностью Fc включают так называемый мутантный вариант LALA, содержащий мутации L234A и L235A в аминокислотной последовательности Fc IgG1. Другой пример антитела IgG1 с подавленной активностью содержит мутацию D265A. Другой пример антитела IgG1 с подавленной активностью включает так называемый мутантный вариант DAPA, содержащий мутации D265A и

R329A в аминокислотной последовательности Fc IgG1. Другое антитело IgG1 с подавленной активностью содержит мутацию N297A, которая приводит к образованию агликозилированных/негликозилированных антител.

[472] Каждый из VH- и VL-доменов антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента и/или мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит последовательности гипервариабельных областей CDR1, CDR2 и CDR3. В определенных аспектах одна или несколько из таких последовательностей CDR содержат консервативные модификации аминокислотных последовательностей, и при этом модифицированные молекулы сохраняют улучшенные свойства связывания по сравнению с исходными антителами или характеризуются ими.

[473] Кроме того, было обнаружено, что в определенных случаях мутирование остатков в пределах каркасных областей оказывается благоприятным для сохранения или усиления антигенсвязывающей способности антитела (см. например, патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 авторства Queen et al.). Молекулы по настоящему изобретению можно модифицировать путем введения таких мутаций в каркасные области их вариабельных областей с целью улучшения свойств связывания.

[474] Другой тип модификации вариабельной области заключается в мутировании аминокислотных остатков в пределах CDR1, CDR2 и/или CDR3 доменов VH и/или VL с улучшением таким образом одного или нескольких свойств связывания (например, аффинности) молекулы (например, антитела или антителоподобной молекулы), представляющей интерес, что известно как "созревание аффинности." Для введения мутации(-ий) можно осуществлять сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез, и эффект в отношении связывания антитела или другое представляющее интерес функциональное свойство можно оценивать в анализах *in vitro* или *in vivo*, описанных в данном документе. Можно вводить консервативные модификации (которые обсуждаются выше). Мутации могут представлять собой аминокислотные замены, добавления или делеции. Более того, как правило, изменяют не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков в пределах CDR-области.

[475] Варианты аминокислотных последовательностей молекул по настоящему изобретению можно получать путем внесения соответствующих нуклеотидных изменений в кодирующие ДНК или путем синтеза требуемых вариантов. Такие варианты включают, например, делеции, вставки или замены остатков в аминокислотных последовательностях молекул по настоящему изобретению. Для получения конечной конструкции осуществляют любую комбинацию делеции, вставки и замещения при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми антигенсвязывающими характеристиками. Изменения аминокислот также могут обеспечивать изменение посттрансляционных процессов для молекул, такое как изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

[476] В настоящую заявку включены варианты молекул, описанных в данном документе, и/или их фрагменты, содержащие консервативные модификации аминокислот

в переменных областях и/или постоянных областях.

Нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии и клетки-хозяева

[477] В настоящем изобретении представлены очищенные молекулы нуклеиновой кислоты (например, по сути очищенные молекулы нуклеиновой кислоты), которые кодируют антитела к ВТС или их антигенсвязывающий фрагмент и/или мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую ВТС-связывающую функциональную единицу и другую связывающую функциональную единицу (например, связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF), описанную в данном документе. В определенных аспектах в настоящем изобретении представлены очищенные молекулы нуклеиновой кислоты (например, по сути очищенные молекулы нуклеиновой кислоты), которые кодируют связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС, описанную в таблице 1. В другом аспекте в настоящем изобретении представлены очищенные молекулы нуклеиновой кислоты (например, по сути очищенные молекулы нуклеиновой кислоты), которые кодируют мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в таблице 3.

[478] Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут кодировать как переменную область, так и постоянную область антитела. Некоторые из последовательностей нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержат нуклеотиды, кодирующие модифицированную последовательность тяжелой цепи, которая характеризуется существенной идентичностью (например, по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 99%) с изначальной последовательностью тяжелой цепи (например, существенной идентичностью с тяжелой цепью NVS1, NVS2, NVS3, NVS4, NVS11, NVS12, NVS13 или NVS14). Некоторые другие последовательности нуклеиновой кислоты содержат нуклеотиды, кодирующие модифицированную последовательность легкой цепи, которая характеризуется существенной идентичностью (например, по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 99%) с изначальной последовательностью легкой цепи (например, существенной идентичностью с легкой цепью NVS1, NVS2, NVS3, NVS4, NVS11, NVS12, NVS13 или NVS14).

[479] Полинуклеотидные последовательности можно получать посредством твердофазного синтеза ДНК *de novo* или посредством ПЦР-мутагенеза существующей последовательности (например, последовательностей, которые описаны в разделе "Примеры" ниже), кодирующей антитело к ВТС или его связывающий фрагмент. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно осуществлять с помощью способов, известных из уровня техники, таких как фосфотриэфирный способ из Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90; фосфодиэфирный способ из Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979; диэтилфосфорамидитный способ из Beaucage et al., Tetra Lett., 22:1859, 1981; и способ с использованием твердой подложки из патента США № 4458066. Введение мутаций в последовательность полинуклеотида с помощью ПЦР можно осуществлять, как

описано, например, в PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; и Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

[480] Также в настоящем изобретении представлены кассеты экспрессии, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС и/или мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF. Более конкретно, в настоящем изобретении представлены кассета экспрессии и/или вектор экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС, характеризующуюся последовательностью, указанной в таблице 1, или в качестве альтернативы кассета экспрессии и/или вектор экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС, конъюгированную с молекулой, описанной в данном документе. В определенных аспектах кассета экспрессии и/или вектор экспрессии содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую любую из молекул, конъюгированных со связывающей функциональной единицей на основе антитела к ВТС, описанного в таблице 1. В другом аспекте в настоящем изобретении представлены кассета экспрессии и/или вектор экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, приведенные в таблице 3.

[481] В одном аспекте в настоящем изобретении представлены кассета экспрессии и/или вектор экспрессии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую VH и VL антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента, где молекула нуклеиновой кислоты на приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична или

комплементарна SEQ ID NO: 11 и 22 соответственно; SEQ ID NO: 35 и 46 соответственно; SEQ ID NO: 55 и 66 соответственно или SEQ ID NO: 79 и 89 соответственно.

[482] В одном аспекте в настоящем изобретении представлены кассета экспрессии и/или вектор экспрессии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь и легкую цепь антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента, где молекула нуклеиновой кислоты на приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична или комплементарна SEQ ID NO: 13 и 24 соответственно; SEQ ID NO: 37 и 48 соответственно; SEQ ID NO: 57 и 68 соответственно или SEQ ID NO: 81 и 91 соответственно.

[483] В одном аспекте в настоящем изобретении представлены кассета экспрессии и/или вектор экспрессии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую 1) VHA и VLA, которые связываются с ВТС, где VHA и VLA кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, на приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или

комплементарной SEQ ID NO: 116 и 122 соответственно; и 2) VNB и VLB, которые связываются с VEGF, где VNB и VLB кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, на приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 117 и 123 соответственно.

[484] В одном аспекте в настоящем изобретении представлены кассета экспрессии и/или вектор экспрессии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую 1) VNA и VLA, которые связываются с BTC, где VNA и VLA кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, на приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 127 и 132 соответственно; и 2) VNB и VLB, которые связываются с VEGF, где VNB и VLB кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, на приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%,

по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 128 и 133 соответственно.

[485] В одном аспекте в настоящем изобретении представлены кассета экспрессии и/или вектор экспрессии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую 1) VHA и VLA, которые связываются с BTC, где VHA и VLA кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, на приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 137 и 142 соответственно; и 2) VHB и VLB, которые связываются с VEGF, где VHB и VLB кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, на приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере

78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 138 и 143 соответственно.

[486] В одном аспекте в настоящем изобретении представлены кассета экспрессии и/или вектор экспрессии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую 1) VHA и VLA, которые связываются с BTC, где VHA и VLA кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, на приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 147 и 151 соответственно; и 2) VHB и VLB, которые связываются с VEGF, где VHB и VLB кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, на приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере

мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 148 и 152 соответственно.

[487] В одном аспекте в настоящем изобретении представлены кассета экспрессии и/или вектор экспрессии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь и легкую цепь, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, на приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной или комплементарной SEQ ID NO: 121 и 126 соответственно; SEQ ID NO: 131 и 136 соответственно; SEQ ID NO: 141 и 146 соответственно или SEQ ID NO: 150 и 155 соответственно.

[488] В одном аспекте в настоящей заявке представлен способ рекомбинантного получения одной или нескольких главных полипептидных цепей мультиспецифической связывающей молекулы, включающий 1) получение одной или нескольких конструкций ДНК, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую каждую из полипептидных цепей мультиспецифической связывающей молекулы; 2) введение указанной(-ых) конструкции(-й) ДНК в один или несколько векторов экспрессии; 3) котрансфекция указанным(-и) вектором(-ами) экспрессии одной или нескольких клеток-хозяев и 4) обеспечение экспрессии и сборки молекулы в клетке-хозяине или в растворе.

[489] В связи с этим в настоящем изобретении представлены выделенные нуклеиновые кислоты, например один или несколько полинуклеотидов, кодирующих мультиспецифическую связывающую молекулу, описанную в данном документе, например мультиспецифическую связывающую молекулу, которая содержит домен, связывающий BTC, и домен, связывающий VEGF, например, как описано в данном документе. В некоторых аспектах выделенная нуклеиновая кислота находится в пределах одного непрерывного полинуклеотида. В других аспектах выделенный полинуклеотид находится в пределах двух или более непрерывных нуклеиновых кислот, включающих последовательности. В некоторых аспектах выделенная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой комплементарную ДНК (сDNA) или матричную РНК (мРНК).

[490] В ряде аспектов выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую домен, связывающий ВТС, или его фрагмент, и/или последовательность, кодирующую домен, связывающий VEGF, или его фрагмент. В ряде аспектов последовательность, кодирующая домен, связывающий ВТС, или его фрагмент, и последовательность, кодирующая домен, связывающий VEGF, расположены в пределах отдельных полинуклеотидов. В ряде аспектов последовательность, кодирующая домен, связывающий ВТС, или его фрагмент, и последовательность, кодирующая домен, связывающий VEGF, расположены в пределах одного полинуклеотида.

[491] В иллюстративном аспекте последовательность ДНК, кодирующая легкую цепь мультиспецифической связывающей молекулы, и последовательность ДНК, кодирующая тяжелую цепь мультиспецифической связывающей молекулы, размещены в пределах отдельных векторов экспрессии. Затем клетку-хозяина котрансфицируют векторами экспрессии при соотношении, обеспечивающем оптимальный результат сборки. Кодированные тяжелые цепи и легкие цепи экспрессируются в клетке-хозяине и претерпевают сборку в функциональные молекулы. В данном документе представлены клетки-хозяева, содержащие такие векторы клонирования и экспрессии.

[492] В другом иллюстративном аспекте последовательности ДНК, кодирующие тяжелую и легкую цепь мультиспецифической связывающей молекулы, размещены в пределах одного вектора экспрессии. Затем вектором экспрессии можно трансфицировать клетку-хозяина. Кодированные тяжелые цепи и легкие цепи экспрессируются в клетке-хозяине и претерпевают сборку в функциональные молекулы. В качестве альтернативы векторами экспрессии можно трансфицировать разные популяции клеток-хозяев, и мультиспецифическая связывающая молекула претерпевает сборку в растворе.

[493] В данном документе представлены векторы клонирования и экспрессии, содержащие одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты или группу молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют мультиспецифическую связывающую молекулу, описанную в данном документе, где вектор является подходящим для рекомбинантного получения мультиспецифической связывающей молекулы. В данном документе представлены способы получения мультиспецифической связывающей молекулы, описанной в данном документе, включающие культивирование клетки-хозяина, раскрытой в данном документе, в условиях, достаточных для экспрессии мультиспецифической связывающей молекулы, и проведение после этого очистки и извлечения мультиспецифической связывающей молекулы из культуры клеток-хозяев.

[494] Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие требуемые молекулы по настоящему изобретению, можно получать с применением рекомбинантных способов, известных в данной области техники, таких как, например, осуществляемые путем скрининга библиотек из клеток, экспрессирующих ген, путем получения гена из вектора, который, как известно, его содержит, или путем непосредственного выделения из клеток и тканей, их содержащих, с применением стандартных методик. В качестве альтернативы нуклеиновая кислота, представляющая интерес, может быть получена путем синтеза, а не

клонирования. Настоящее изобретение также предусматривает РНК-конструкцию, которую можно вводить путем прямой трансфекции в клетку. Способ получения мРНК для применения в трансфекции предусматривает транскрипцию *in vitro* (IVT) матрицы с использованием специально разработанных праймеров с последующим добавлением полиА с получением конструкции, содержащей 3'- и 5'-нетранслируемые последовательности ("UTR"), 5'-кэп и/или внутренний участок посадки рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, которая подлежит экспрессии, и полиА-хвост, обычно длиной 50-2000 оснований. С помощью РНК, полученной таким образом, можно эффективно трансфицировать различные типы клеток. В одном аспекте матрица содержит последовательности полипептидов мультиспецифической связывающей молекулы, например биспецифической молекулы, например биспецифического антитела или биспецифической антителоподобной молекулы. В одном аспекте вектор на основе РНК вводят путем трансдукции в клетку с помощью электропорации.

[495] Для экспрессии требуемых молекул по настоящему изобретению можно использовать различные векторы. Как вирусные, так и невирусные векторы экспрессии можно применять для получения белков в клетке-хозяине, представляющей собой клетку млекопитающего. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомные векторы, как правило, с кассетой экспрессии для экспрессии белка или РНК, а также человеческие искусственные хромосомы (см., например, Harrington et al., *Nat Genet.* 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, применимые для экспрессии связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС и/или мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, в клетках млекопитающих (например, человека), включают рThioHis A, B и C, рсDNA3.1/His, рEBVHis A, B и C, (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), векторы MPSV и многочисленные другие векторы, известные из уровня техники для экспрессии других белков. Применимые вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов (AAV), вирусов герпеса, векторы на основе SV40, папилломавируса, вируса Эпштейна-Барр НВР, векторы на основе вируса осповакцины и вируса леса Семлики (SFV). См., Brent et al., выше; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., *Cell* 68:143, 1992. Способы создания вирусных векторов хорошо известны из уровня техники и дадут возможность квалифицированному специалисту в данной области техники создать вирусные векторы по настоящему изобретению (см., например, патент США № 7465583).

[496] AAV представляют собой небольшие вирусы с однонитевой ДНК, для которых требуется вирус-помощник для способствования эффективной репликации. Вирусный вектор содержит геном вектора и белковый капсид. Капсид вирусного вектора может быть получен из любого из серотипов AAV, известных из уровня техники, включая идентифицированные в настоящее время серотипы AAV человека и отличных от человека животных и серотипы AAV, которые еще предстоит идентифицировать, например AAV1,

AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и AAV12. Капсиды вирусов можно комбинировать и сочетать с другими компонентами вектора с образованием гибридного вирусного вектора. Например, ITR и капсид вирусного вектора могут происходить из разных серотипов AAV. В одном аспекте ITR могут быть получены из серотипа AAV2, в то время как капсид, например, из серотипа AAV2 или AAV8. Кроме того, специалист в данной области техники поймет, что капсид вектора также может являться мозаичным капсидом (например, капсидом, состоящим из смеси капсидных белков, относящихся к различным серотипам) или даже химерным капсидом (например, капсидным белком, содержащим чужеродную или неродственную белковую последовательность для создания маркеров и/или изменения тканевого тропизма). Предполагается, что вирусный вектор по настоящему изобретению может содержать капсид AAV2, AAV5, AAV8 или AAV9. Кроме того, предусматривается, что в настоящем изобретении представлены способы получения молекулы по настоящему изобретению с помощью вирусного вектора, содержащего капсид AAV8. В другом аспекте в настоящем изобретении представлены способы получения молекулы по настоящему изобретению с помощью вирусного вектора, содержащего капсид AAV9. В определенных аспектах в настоящем изобретении представлены способы получения молекулы по настоящему изобретению с помощью вирусного вектора, содержащего капсид AAV5 или капсид AAV6. В одном аспекте можно обеспечивать экспрессию антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента с применением вектора на основе AAV. В другом аспекте можно обеспечивать экспрессию связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС мультиспецифической связывающей молекулы с применением вектора на основе AAV. В другом аспекте можно обеспечивать экспрессию связывающей функциональной единицы на основе антитела к VEGF мультиспецифической связывающей молекулы с применением вектора на основе AAV.

[497] Выбор вектора экспрессии зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых должен экспрессироваться вектор. Как правило, векторы экспрессии содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими цепь или фрагмент антитела или цепь или фрагмент антитела, конъюгированные со связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС. В некоторых аспектах индуцируемый промотор используют для предотвращения экспрессии встроенных последовательностей в условиях, отличающихся от индуцирующих. Индуцируемые промоторы включают, например, арабинозный, lacZ, металлотioneиновый промотор или промотор белка теплового шока. Культуры трансформированных организмов можно размножить в неиндуцирующих условиях без смещения популяции в сторону кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. Для эффективной экспрессии цепи или фрагмента антитела или цепи или фрагмента антитела, конъюгированных со связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС, помимо промоторов также могут быть необходимы или требоваться другие

регуляторные элементы. Эти элементы, как правило, включают иницирующий кодон ATG и смежный сайт связывания рибосомы или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии можно повысить за счет включения энхансеров, соответствующих используемой клеточной системе (см., например, Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994; и Bittner et al., *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). Например, для повышения экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать энхансер SV40 или энхансер CMV.

[498] В векторах экспрессии также может быть предусмотрена сигнальная последовательность секреции, расположенная с образованием слитого белка или биспецифического антитела с последовательностями полипептидов или последовательностями антител, конъюгированных со связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС. Чаще такие вставляемые последовательности соединяют с сигнальными последовательностями перед включением в вектор. Векторы, подлежащие применению для получения последовательностей, кодирующих переменные домены легких и тяжелых цепей антитела или антитела, конъюгированные со связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС, иногда также кодируют константные области или их части. Такие векторы обеспечивают экспрессию переменных областей в виде слитых белков или биспецифических антител с константными областями, что тем самым приводит к получению интактных антител или антигенсвязывающих фрагментов. Как правило, такие константные области являются человеческими.

[499] В настоящем изобретении представлен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование описанных ниже клеток-хозяев в подходящих условиях для экспрессии антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента и/или мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF. В одном аспекте способ дополнительно включает проведение очистки антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента и/или мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF.

[500] Клетки-хозяева для несения и экспрессии связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС и/или мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, могут являться либо прокариотическими, либо эукариотическими. *E. coli* является одним прокариотическим хозяином, применимым для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микробные хозяева, подходящие для применения, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. Для этих прокариотических хозяев также можно создать

векторы экспрессии, которые, как правило, содержат последовательности для управления экспрессией, совместимые с клеткой-хозяином (например, точку начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое количество разнообразных хорошо известных промоторов, как, например, лактозная промоторная система, триптофановая (*trp*) промоторная система, бета-лактамазная промоторная система или промоторная система из фага лямбда. Промоторы, как правило, управляют экспрессией, необязательно с операторной последовательностью, и имеют последовательности сайта связывания рибосомы и т. п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Для экспрессии связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС и/или мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанной в данном документе, также можно использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Также можно применять клетки насекомых в сочетании с бакуловирусными векторами.

[501] В некоторых предпочтительных аспектах для экспрессии и получения связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС и/или мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, по настоящему изобретению применяются клетки-хозяева млекопитающих. Например, они могут представлять собой либо линию клеток гибридомы, экспрессирующих эндогенные гены иммуноглобулинов, либо линию клеток млекопитающих, несущих экзогенный вектор экспрессии. Они включают любую нормальную, мортальную или нормальную или аномальную иммортальную клетку животного или человека. Например, специалистам в данной области техники известен ряд разработанных подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины и включающих линии клеток СНО, различные линии клеток *Cos*, клетки *HeLa*, линии клеток миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Применение тканевой культуры клеток млекопитающих для экспрессии полипептидов в общих чертах обсуждается, например, в Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Векторы экспрессии для клеток-хозяев, представляющих собой клетки млекопитающих, могут включать последовательности для управления экспрессией, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49-68, 1986), и необходимые сайты, несущие информацию для процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминатора транскрипции. Эти векторы экспрессии обычно содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфическими в отношении типа клеток, специфическими в отношении стадии развития и/или модулируемыми или регулируемыми. Применимые промоторы включают без ограничения металлотioneиновый промотор, конститутивный большой поздний промотор

аденовируса, индуцируемый дексаметазоном промотор MMTV, промотор SV40, промотор polIII MRP, конститутивный промотор MPSV, индуцируемый тетрациклином промотор CMV (такой как немедленно-ранний промотор CMV человека), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные из уровня техники.

[502] Способы введения векторов экспрессии, содержащих последовательности полинуклеотидов, представляющие интерес, изменяются в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекцию с использованием хлорида кальция обычно используют для прокариотических клеток, тогда как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеток-хозяев. (См. в целом Sambrook, et al.). Другие способы включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, трансформацию, опосредованную липосомами, инъекцию и микроинъекцию, баллистические способы, вирусомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион:нуклеиновая кислота, депротенинизированную ДНК, искусственные вирионы, слияние со структурным белком VP22 вируса герпеса (Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997), усиленное средством поглощение ДНК и трансдукцию *ex vivo*. Для длительного продуцирования рекомбинантных белков с высоким выходом часто будет требоваться стабильная экспрессия.

[503] Например, линии клеток, которые стабильно экспрессируют связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и/или мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, можно получать с применением векторов экспрессии по настоящему изобретению, которые содержат вирусные точки начала репликации или эндогенные элементы экспрессии и ген селективируемого маркера. После введения вектора клеткам можно обеспечить рост в течение 1-2 дней в обогащенной среде перед их переносом в селективную среду. Целью селективируемого маркера является придание устойчивости к факторам отбора, и его присутствие обеспечивает возможность роста клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности в селективных средах. Пролиферация устойчивых стабильно трансфицированных клеток может обеспечиваться с применением методик тканевой культуры, соответствующих типу клеток. В настоящем изобретении дополнительно представлен способ получения связывающих функциональных единиц на основе антитела к ВТС и/или молекул, конъюгированных со связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС, описанных в данном документе, где клетку-хозяина, способную продуцировать связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС или молекулы, конъюгированные со связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС, описанные в данном документе, культивируют в подходящих условиях для получения одной или нескольких связывающих функциональных единиц на основе антитела к ВТС и/или молекул, конъюгированных со связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС. Способ может дополнительно включать выделение связывающих

функциональных единиц на основе антитела к ВТС и/или молекул, конъюгированных со связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС, по настоящему изобретению.

[504] Для доставки гена в глаз можно применять векторы экспрессии, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и/или мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, по настоящему изобретению. В определенных аспектах настоящего изобретения вектор экспрессии кодирует антитело, которое связано с одной или несколькими связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС по настоящему изобретению и является подходящим для доставки в глаз. В других аспектах настоящего изобретения терапевтическая связывающая функциональная единица и связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС кодируются в одном или нескольких векторах экспрессии, подходящих для доставки в глаз. Способы доставки продукта гена в глаз известны из уровня техники.

Получение антитела

[505] Полипептиды и антитела и их фрагменты можно получать посредством ряда различных методик, в том числе традиционного способа получения моноклональных антител, например, стандартной методики гибридизации соматических клеток согласно Kohler and Milstein, (1975) Nature 256: 495.

[506] Химерные или гуманизированные антитела по настоящему изобретению можно получать на основе последовательности мышинового моноклонального антитела, полученного, как описано на всем протяжении данного документа. ДНК, кодирующую тяжелую и легкую цепи иммуноглобулинов, можно получить из представляющей интерес мышинной гибридомы и сконструировать таким образом, чтобы она содержала последовательности иммуноглобулинов, отличные от мышинных (например, человеческие), с применением стандартных методик молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела переменные области мыши можно связать с константными областями человека с применением способов, известных из уровня техники (см., например, патент США № 4816567 за авторством Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела CDR-области мыши можно вставить в каркас человека с применением способов, известных из уровня техники. См., например, патент США № 5225539 за авторством Winter, и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 за авторством Queen et al.

[507] В определенном аспекте антитела по настоящему изобретению представляют собой человеческие моноклональные антитела. Такие человеческие моноклональные антитела, направленные против ВТС и/или VEGF, можно получать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части человеческой иммунной системы вместо мышинной системы. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши

включают мышей, называемых в данном документе соответственно мыши HuMAb и мыши КМ, и их совокупно называют в данном документе "мышами с Ig человека". В другом аспекте выработку человеческих антител по настоящему изобретению можно обеспечивать с использованием мыши, которая несет последовательности человеческого иммуноглобулина, содержащиеся в трансгенах и трансхромосомах, как например мыши, которая несет трансген человеческой тяжелой цепи и трансхромосому, в которой закодирована человеческая легкая цепь. Такие мыши, обозначаемые в данном документе как "мыши КМ", подробно описаны в РСТ-публикации WO 02/43478 за авторством Ishida et al.

[508] Более того, альтернативные системы на основе трансгенных животных, у которых экспрессируются гены человеческих иммуноглобулинов, доступны в данной области техники, и их можно использовать для выработки антител по настоящему изобретению. Например, можно применять альтернативную трансгенную систему, называемую Xenomouse (Abgenix, Inc.). Такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963 за авторством Kucherlapati et al.

[509] Более того, альтернативные системы на основе трансхромосомных животных, у которых экспрессируются гены человеческих иммуноглобулинов, доступны в данной области техники, и их можно использовать для выработки антител по настоящему изобретению. Например, можно использовать мышей, несущих как трансхромосому, в которой закодирована человеческая тяжелую цепь, так и трансхромосому, в которой закодирована человеческая легкая цепь, обозначаемых как "мыши ТС"; такие мыши описаны в Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Кроме того, коровы, несущие трансхромосомы, в которых закодированы человеческие тяжелая и легкая цепи, были описаны в данной области техники (Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20:889-894), и их можно использовать для выработки антител по настоящему изобретению.

[510] Человеческие моноклональные антитела по настоящему изобретению также можно получать с применением способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулинов человека. Такие способы фагового дисплея для выделения антител человека определены в уровне техники или описаны в примерах ниже. См., например, патенты США №№ 5223409; 5403484 и 5571698 за авторством Ladner et al.; патенты США №№ 5427908 и 5580717 за авторством Dower et al.; патенты США №№ 5969108 и 6172197 за авторством McCafferty et al.; и патенты США №№ 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 за авторством Griffiths et al.

[511] Человеческие моноклональные антитела по настоящему изобретению также можно получить с применением мышей SCID, в которых были перенесены иммунные клетки человека таким образом, что после иммунизации может генерироваться ответ в виде продуцирования человеческих антител. Такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5476996 и 5698767 за авторством Wilson et al.

[512] Для получения и экспрессии последовательности измененных связывающих функциональных единиц на основе антитела к ВТС и/или связывающих функциональных

единиц на основе антитела к VEGF можно применять стандартные методики молекулярной биологии. Измененные связывающие функциональные единицы на основе антитела к BTC или связывающие функциональные единицы на основе антитела к VEGF, кодируемые измененной(-ыми) последовательностью(-ями), являются такими, которые сохраняют одно, некоторые или все из функциональных свойств измененных связывающих функциональных единиц на основе антитела к BTC или связывающих функциональных единиц на основе антитела к VEGF.

[513] В определенных аспектах способов конструирования связывающих функциональных единиц на основе антитела к BTC или связывающих функциональных единиц на основе антитела к VEGF можно вводить мутации случайным образом или селективно по всей кодирующей последовательности антитела к BTC или антитела к VEGF или ее части, и полученные в результате модифицированные антитела к BTC или антитела к VEGF можно подвергать скринингу в отношении активности связывания и/или других функциональных свойств, как описано в данном документе. Способы введения мутаций были описаны в уровне техники. Например, в публикации согласно РСТ WO 02/092780 за авторством Short описываются способы создания и скрининга мутантных вариантов антител с применением насыщающего мутагенеза, сборки с лигированием синтезированных фрагментов или их комбинации. В качестве альтернативы в публикации согласно РСТ WO 03/074679 за авторством Lazar et al. описываются способы применения способов компьютерного скрининга для оптимизации физико-химических свойств антител.

[514] В определенных аспектах настоящего изобретения антитела могут быть сконструированы с удалением сайтов дезамидирования. Как известно, дезамидирование вызывает структурные и функциональные изменения в пептиде или белке. Дезамидирование может приводить к снижению биоактивности, а также изменениям фармакокинетики и антигенности фармацевтического белка (Anal Chem. 2005 Mar 1;77(5):1432-9). В определенных других аспектах настоящего изобретения антитела и антитела к BTC или их функциональные фрагменты могут быть сконструированы с добавлением или удалением сайтов расщепления протеазой.

[515] У белков, представляющих собой антитела, полученные из представителей семейства, к которому относятся двугорбые верблюды и одногорбые верблюды (*Camelus bactrianus* и *Camelus dromaderius*), в том числе представителей из Нового Света, таких как виды лам (*Lama pacos*, *Lama glama* и *Lama vicugna*), были определены характеристики размера, сложности структуры и антигенности у субъектов-людей. У определенных антител IgG этого семейства млекопитающих, которые обнаруживаются в природе, отсутствуют легкие цепи, и, следовательно, они отличаются в плане структуры от типичной четырехцепочечной четвертичной структуры, характеризующейся двумя тяжелыми и двумя легкими цепями, у антител от других животных. См. РСТ/EP93/02214 (WO 94/04678, опубликованную 3 марта 1994 года).

[516] Область антитела верблюдовых, которая представляет собой небольшой

отдельный вариабельный домен, идентифицированный как V_HH, можно получить с помощью генной инженерии с получением небольшого белка, характеризующегося высокой аффинностью в отношении мишени, что приводит в результате к полученному из антитела белку с низкой молекулярной массой, известному как "нанотело верблюдовых". См. патент США № 5759808, выданный 2 июня 1998 года; также см. Stijlemans, B. et al., 2004 *J. Biol. Chem.* 279: 1256-1261; Dumoulin, M. et al., 2003 *Nature* 424: 783-788; Pleschberger, M. et al. 2003 *Bioconjugate Chem.* 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. et al. 2002 *Int. J. Cancer.* 89: 456-62 и Lauwereys, M. et al. 1998 *EMBO J.* 17: 3512-3520. Сконструированные библиотеки антител и антигенсвязывающих фрагментов антител верблюдовых являются коммерчески доступными, например, от Ablynx, Гент, Бельгия. Как и в случае других антител, происходящих из организма, отличного от человека, аминокислотную последовательность антитела верблюдовых можно изменить рекомбинантным способом с получением последовательности, которая характеризуется более близким сходством с последовательностью антитела человека, т. е. нанотело может быть "гуманизировано".

[517] Нанотело верблюдовых имеет молекулярную массу, составляющую примерно одну десятую от массы молекулы IgG человека, и белок имеет физический диаметр лишь несколько нанометров. Одним следствием небольшого размера является способность нанотел верблюдовых связываться с антигенными сайтами, которые являются функционально нераспознаваемыми для более крупных белков, представляющих собой антитела, т. е. нанотела верблюдовых являются применимыми в качестве реагентов для выявления антигенов, которые в ином случае являются скрытыми при использовании классических иммунологических методик, и в качестве возможных терапевтических средств. Таким образом, еще одним следствием небольшого размера является то, что нанотело верблюдовых может осуществлять ингибирование в результате связывания с конкретным сайтом в бороздке или узком углублении целевого белка и, следовательно, может служить в качестве, которое более точно походит на функцию классического низкомолекулярного лекарственного средства, чем таковую у классического антитела.

[518] Низкая молекулярная масса и компактный размер дополнительно приводят к тому, что нанотела верблюдовых являются чрезвычайно термостабильными, устойчивыми к экстремальным значениям pH и к протеолитическому расщеплению и характеризуются слабой антигенностью. Другим следствием является то, что нанотела верблюдовых легко перемещаются из кровеносной системы в ткани. Нанотела могут дополнительно способствовать транспорту лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер. См. заявку на патент США 20040161738, опубликованную 19 августа 2004 года. Кроме того, эти молекулы могут полностью экспрессироваться в прокариотических клетках, таких как *E. coli*, и они экспрессируются в виде биспецифических антител или слитых белков с белками бактериофага и являются функциональными.

[519] Соответственно, объектом настоящего изобретения является антитело или нанотело верблюдовых, характеризующееся, например, высокой аффинностью к ВТС (т.

е. в случаях, где связывающая функциональная единица на основе антитела к ВТС находится в формате антитела или нанотела верблюдовых). В определенных аспектах в данном документе антитело или нанотело верблюдовых продуцируется в естественных условиях у животного из семейства верблюдовых, т. е. оно продуцируется верблюдовыми после иммунизации с помощью ВТС или его пептидного фрагмента с применением методик, описанных в данном документе для других антител. В качестве альтернативы нанотело верблюдовых конструируют (т. е. получают посредством отбора, например) из фаговой библиотеки, в которой представлены подвергнутые соответствующему мутагенезу белки, представляющие собой нанотела верблюдовых, с применением процедур пэннинга с использованием соответствующей мишени. Сконструированные нанотела дополнительно можно адаптировать посредством генетической инженерии. Нанотела верблюдовых могут быть, например, специфическими в отношении терапевтической мишени и связанными со связывающей функциональной единицей на основе антитела к ВТС, как описано в данном документе. В конкретных аспектах антитело или нанотело верблюдовых получают с помощью прививания последовательностей CDR тяжелой или легкой цепи человеческих антител по настоящему изобретению на последовательности каркасных областей нанотела или однодоменного антитела, как описано, например, в РСТ/EP93/02214.

Фармацевтические композиции

[520] В настоящем изобретении представлены фармацевтические композиции, содержащие эффективное количество антитела к ВТС или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе. В настоящем изобретении также представлены фармацевтические композиции, содержащие эффективное количество антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента или мультиспецифической связывающей молекулы, описанных в данном документе (например, те, которые описаны в таблицах 1 и 3).

[521] Фармацевтические композиции на основе терапевтических и диагностических средств можно получать путем смешивания с физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, взвесей, водных растворов, лосьонов или суспензий (см. например, Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: oral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.).

[522] В определенных конкретных аспектах связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС в соответствии с таблицей 1 можно составлять совместно с фармацевтически приемлемыми вспомогательным веществом, разбавителем

или носителем или отдельно от них. В настоящем изобретении также представлены композиции, содержащие связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС, составленную совместно с фармацевтически приемлемыми вспомогательным веществом, разбавителем или носителем или отдельно от них.

[523] В определенных аспектах в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую 1) связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и 2) связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, например антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент, связанные с антителом к VEGF или его антигенсвязывающим фрагментом. Композиция может быть представлена в лиофилизированной дозированной форме, и ее можно восстанавливать с помощью воды для инъекций. Композиция может содержать по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 12 мг, по меньшей мере 14 мг, по меньшей мере 16 мг, по меньшей мере 18 мг, по меньшей мере 20 мг, по меньшей мере 22 мг, по меньшей мере 24 мг, по меньшей мере 26 мг, по меньшей мере 28 мг, по меньшей мере 30 мг, по меньшей мере 35 мг, по меньшей мере 40 мг, по меньшей мере 45 мг или по меньшей мере 50 мг биспецифического антитела (например, содержащего связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF). Композиция может дополнительно содержать по меньшей мере 10 мМ, по меньшей мере 15 мМ, по меньшей мере 20 мМ, по меньшей мере 25 мМ, по меньшей мере 30 мМ, по меньшей мере 35 мМ, по меньшей мере 40 мМ, по меньшей мере 45 мМ или по меньшей мере 50 мМ гистидина, по меньшей мере 200 мМ, по меньшей мере 210 мМ, по меньшей мере 220 мМ, по меньшей мере 230 мМ, по меньшей мере 240 мМ или по меньшей мере 250 мМ сахарозы и/или по меньшей мере 0,01%, по меньшей мере 0,02%, по меньшей мере 0,04%, по меньшей мере 0,06%, по меньшей мере 0,08%, по меньшей мере 0,1%, по меньшей мере 0,2% или по меньшей мере 0,5% полисорбата 20.

[524] Композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены вместе с фармацевтически приемлемыми вспомогательным веществом, разбавителем или носителем. Композиции могут дополнительно содержать одно или несколько других терапевтических средств, которые являются подходящими для лечения или предупреждения, например, состояний или нарушений, ассоциированных с офтальмологическими состояниями или нарушениями. Фармацевтически приемлемые носители усиливают или стабилизируют композицию, или их можно применять для облегчения получения композиции. Фармацевтически приемлемые носители включают растворители, дисперсионные среды, средства для покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и т. п., которые являются физиологически совместимыми.

[525] Молекулу по настоящему изобретению также можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с применением одного или нескольких из ряда различных способов, известных из уровня техники. Как будет понятно специалисту в

данной области техники, путь и/или способ введения будут варьироваться в зависимости от требуемых результатов. Выбранные пути введения для антител включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, посредством инъекции или инфузии. Парентеральное введение может представлять собой способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно осуществляемые посредством инъекции, и включает без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсульную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию. В качестве альтернативы композиции по настоящему изобретению можно вводить посредством пути, отличного от парентерального, такого как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

[526] В определенных аспектах фармацевтическую композицию вводят системно и обеспечивают локализацию в ткани, представляющей интерес, на основе ее аффинности по отношению к ВТС. Предпочтительно, чтобы композиция являлась подходящей для непосредственного введения в глаз, более конкретно композиция может быть подходящей для интравитреального и/или субретинального введения. Фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, разбавитель или носитель должны быть подходящими для введения в глаз (например, путем инъекции или субконъюнктивального введения), более конкретно для интравитреального и/или субретинального введения.

[527] Композиция должна быть стерильной и текучей. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительным является включение в композицию изотонических средств, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит или сорбит, и хлорида натрия.

[528] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно получить в соответствии со способами, хорошо известными и обычно осуществляемыми в данной области техники. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; и Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Фармацевтические композиции предпочтительно изготавливают в соответствии с положениями GMP. Как правило, терапевтически эффективную дозу или эффективную дозу молекулы используют в фармацевтических композициях по настоящему изобретению.

[529] Молекулы, конъюгированные со связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС или антитела к VEGF, составляют в фармацевтически приемлемые лекарственные формы посредством традиционных способов, известных специалистам в данной области. Схемы дозирования корректируют для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа).

Например, можно вводить одну болюсную дозу, можно вводить несколько разделенных доз в течение некоторого времени, или дозу можно пропорционально снижать или увеличивать в соответствии с потребностями терапевтической ситуации. Особенно преимущественным является составление композиций для парентерального применения в единичной дозированной форме для удобства введения и однородности дозирования. Единичная дозированная форма, как используется в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем.

[530] Композиция должна быть стерильной и текучей. Во многих случаях предпочтительным является включение в композицию изотонических средств, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит или сорбит, и хлорида натрия.

[531] В определенных аспектах молекулы или их фрагменты по настоящему изобретению можно составлять таким образом, чтобы гарантировать надлежащее распределение *in vivo*.

[532] В настоящем изобретении представлен набор, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент и/или мультиспецифическую связывающую молекулу, например мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF.

[533] В одном аспекте набор дополнительно содержит инструкцию по применению, которая может обеспечивать информацию относительно дозы, пути введения, схемы введения и общей продолжительности лечения. В другом аспекте набор дополнительно содержит средства для введения молекулы по настоящему изобретению, например автоинъектор, шприц, флакон, предварительно заполненный шприц и/или предварительно заполненный шприц-ручка.

[534] Эти наборы могут содержать дополнительные терапевтические средства для лечения субъекта, у которого имеется патологическое нарушение, опосредованное ВТС и/или VEGF, например DME. В одном аспекте дополнительные терапевтические средства включают без ограничения Beovu/бролуцизумаб, Lucentis/панибизумаб, Avastin/бевизицумаб, Eylea/афлиберцепт, пэгаптаниб, пазопаниб, сорафиниб, сунитиниб и/или рапамицин.

Диагностические и терапевтические варианты применения

[535] Молекулы по настоящему изобретению имеют множество диагностических и терапевтических областей применения. Например, их можно применять для иммуноферментного анализа, при этом плечи, связывают конкретный эпитоп на ферменте, и другие части молекулы связывают иммобилизирующую матрицу. Иммуноферментный анализ с применением антителоподобных молекул рассматривается у

Nolan et al. (Nolan et al., (1990) *Biochem. Biophys. Acta.* 1040:1-11). Мультиспецифические связывающие молекулы также можно применять для диагностики различных заболеваний, например карциномы поджелудочной железы, рака молочной железы, аденокарциномы эндометрия, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, карциномы желудка, диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной глаукомы, диабетической ретинопатии, макулярного отека, патологической миопии, окклюзий вен сетчатки, ретинопатии недоношенных, аномальной пролиферации сосудов, ассоциированной с факоматозами, центральной серозной хориоретинопатии и острой мультифокальной плакоидной пигментной эпителиопатии.

[536] Молекулы по настоящему изобретению имеют диагностические и терапевтические варианты применимости *in vitro* и *in vivo*. Например, такие молекулы можно вводить в клетки в культуре, например *in vitro* или *in vivo*, или субъекту, например *in vivo*, для лечения, предупреждения или проведения диагностики ряда различных нарушений.

[537] В одном аспекте молекулы по настоящему изобретению являются применимыми для обнаружения присутствия BTC и/или VEGF в биологическом образце. Используемый в данном документе термин "обнаружение" охватывает количественное или качественное обнаружение. В определенных аспектах биологический образец предусматривает клетку или ткань. В определенных аспектах такие ткани включают нормальные и/или раковые ткани, которые экспрессируют BTC и/или VEGF на более высоких уровнях по сравнению с другими тканями.

[538] В одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ обнаружения присутствия BTC и/или VEGF в биологическом образце. В определенных аспектах способ включает приведение биологического образца в контакт с мультиспецифической молекулой по настоящему изобретению в условиях, допускающих связывание антитела с антигеном, и обнаружение того, формируется ли комплекс между антителом и антигеном. Биологический образец может включать без ограничения образцы мочи или крови.

[539] Также включен способ диагностирования нарушения, ассоциированного с экспрессией BTC и/или VEGF. В определенных аспектах способ включает приведение тестируемой клетки в контакт с мультиспецифической молекулой по настоящему изобретению; определение уровня экспрессии (либо количественно, либо качественно) BTC и/или VEGF в тестируемой клетке путем обнаружения связывания мультиспецифической молекулы по настоящему изобретению и сравнение уровня экспрессии BTC и/или VEGF в тестируемой клетке с уровнем экспрессии BTC и/или VEGF в контрольной клетке (например, нормальной клетке, происходящей из той же ткани, что и тестируемая клетка, или клетке, не зараженной вирусом), где более высокий уровень присутствия BTC и/или VEGF в тестируемой клетке по сравнению с контрольной клеткой указывает на наличие нарушения, ассоциированного с BTC и/или VEGF. В определенных аспектах тестируемую клетку получают от индивидуума с подозрением на

наличие у него патологического нарушения, опосредованного BTC и/или VEGF.

[540] Молекулы, описанные в данном документе, можно применять в качестве лекарственного препарата. Как представлено ниже (например, в примере 13), комбинированное лечение антителом к BTC и антителом к VEGF неожиданно приводило к снижению утечки жидкости из сетчатки в животных моделях на 77% по сравнению с контрольными животными.

[541] В частности, антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент и/или мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению могут использоваться для лечения карциномы поджелудочной железы, рака молочной железы, аденокарциномы эндометрия, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и карциномы желудка. В другом аспекте антитело к BTC или его антигенсвязывающий фрагмент и/или мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению могут использоваться для лечения офтальмологических состояний или нарушений, например состояний или нарушений, ассоциированных с заболеванием сосудов сетчатки, у субъекта.

[542] В настоящем изобретении представлен способ лечения патологических нарушений, опосредованных BTC и/или VEGF, путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества молекул по настоящему изобретению. Патологические нарушения, опосредованные BTC и/или VEGF, включают состояния, ассоциированные с аномальными уровнями BTC и/или VEGF или характеризующиеся их наличием, и/или заболевания или состояния, которые можно лечить путем снижения или подавления индуцированной BTC и/или VEGF активности в клетках- или тканях-мишенях, например клетках сетчатки. В одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ лечения заболевания или нарушения, ассоциированных с повышенными уровнями и/или активностью BTC и/или VEGF. В одном аспекте заболевание или нарушение представляют собой заболевание или нарушение со стороны сетчатки, например DME.

[543] Пациенты с диабетом часто сталкиваются с офтальмологическими осложнениями, затрагивающими разные части глаза, включая сетчатку (DR или диабетическая ретинопатия), макулу (DME), хрусталик (катаракта) и зрительный нерв (глаукома). Распространенность DME среди тех, у кого имеется диабет 1 типа (T1D) и диабет 2 типа (T2D), варьируется в зависимости от региона. Значения частоты распространенности находятся в диапазоне от 11% в Европе до 7,5% в некоторых странах Африки. Затронуты более 31 миллиона человек по всему миру. Примерно у одного из 14 человек с диабетом имеется некоторая степень DME. По оценкам, у 20% людей, живущих с T1D, и 25% тех, у кого имеется T2D, может ожидать развитие DME. DME является основной причиной слепоты в популяции людей работоспособного возраста в развитых странах.

[544] DME представляет собой подтип DR, который наиболее часто возникает у пациентов с прогрессирующей диабетической ретинопатией (PDR), но может возникать на любой стадии заболевания. Его причиной является непрерывный рост новых

кровеносных сосудов под сетчаткой, из которых происходит утечка жидкости и липидов, что приводит к набуханию макулы, что может приводить в результате к значительной нечеткости зрения и способствовать риску развития слепоты, обусловленной DR. DME приводит к значительному нарушению зрения, в том числе нечеткости зрения и искажению изображения, а также изменениями цветового зрения и скотоме (Yau et al., *Diabetes Care* 35:556-564, 2012; Ting et al., *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2016: 209-22). DME является главной причиной сниженной остроты зрения при диабетической ретинопатии (20% при T1D и 40% при T2D). Патофизиология DR/DME является сложной, учитывая взаимодействие между разными биохимическими путями, воспалительными медиаторами и ангиогенными факторами.

[545] Ингибиторы VEGF являются средствами лечения первой линии при диффузном DME, затрагивающем центральную область. Хотя средства, направленные против VEGF, обеспечивают снижение макулярного отека, подавляют ангиогенез и улучшают зрение, не все пациенты с DME испытывают значительные продолжительные улучшения зрения или характеризуются адекватным ответом на лечение, что указывает на роль других медиаторов в патологии заболевания.

[546] В настоящем изобретении представлен способ лечения офтальмологического нарушения, например DME, путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества молекул по настоящему изобретению, например антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента или мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF. В настоящем изобретении также представлен способ предупреждения прогрессирования офтальмологического нарушения, например DME, путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества молекул по настоящему изобретению, например антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента или мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF.

[547] В настоящем изобретении дополнительно представлен способ лечения диабетической ретинопатии (DR) или пролиферативной диабетической ретинопатии (PDR) путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества молекул по настоящему изобретению.

[548] В настоящем изобретении дополнительно представлен способ лечения возрастной макулярной дегенерации (AMD, например неоваскулярной AMD) путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества молекул по настоящему изобретению.

[549] Более того, в настоящем изобретении представлены способы лечения окклюзии вен сетчатки (RVO), включая окклюзию центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзию ветвей вены сетчатки (BRVO), и макулярного отека, вторичного по отношению

к CRVO или BRVO, ангионевротического отека, мультифокального хориоидита, миопической хориоидальной неоваскуляризации и/или ретинопатии недоношенных, хориоидальной неоваскуляризации (CNV), проницаемости сосудов сетчатки, и/или включая CNV, ассоциированную с nAMD (неоваскулярной AMD), последствий, ассоциированных с ишемией сетчатки, осуществляемые путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества молекул по настоящему изобретению.

[550] Лечение и/или предупреждение заболевания сетчатки, например макулярного отека, DME, PDR или DR и AMD, например неоваскулярной AMD, может быть определено офтальмологом или работником сферы здравоохранения с применением клинически значимых измерений зрительной функции и/или анатомической структуры сетчатки. Лечение состояний или нарушений, ассоциированных с заболеванием сосудов сетчатки, означает любое действие (например, введение антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента и/или мультиспецифической связывающей молекулы, описанных в данном документе), которое приводит или в отношении которого предусматривается, что оно приведет к улучшению или сохранению зрительной функции и/или анатомической структуры сетчатки. Кроме того, предупреждение, когда оно относится к состояниям или нарушениям, ассоциированным с заболеванием сосудов сетчатки, означает любое действие (например, введение антитела к ВТС или его антигенсвязывающего фрагмента и/или мультиспецифической связывающей молекулы, описанных в данном документе), которое обеспечивает предупреждение или замедление ухудшения зрительной функции, анатомической структуры сетчатки и/или параметра заболевания сосудов сетчатки, определенных в данном документе, у пациента с риском указанного ухудшения.

[551] Зрительная функция может включать, например, остроту зрения, остроту зрения при слабом освещении, поле зрения, центральное поле зрения, периферическое зрение, контрастную чувствительность, темновую адаптацию, восстановление после фотостресса, различение цветов, скорость чтения, зависимость от вспомогательных устройств (например, крупный шрифт, увеличительные устройства, телескопы), распознавание лиц, умение управлять автомобильным транспортным средством, способность выполнять один или несколько видов повседневной деятельности и/или сообщаемую пациентом степень удовлетворенности, связанной со зрительной функцией.

[552] В настоящем изобретении дополнительно представлен способ улучшения зрительной функции или предупреждения дальнейшего падения зрительных функций путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества молекул по настоящему изобретению.

[553] Иллюстративные показатели для измерения зрительной функции включают остроту зрения по таблице Снеллена, остроту зрения по ETDRS, остроту зрения при слабом освещении, сетку Амслера, тест поля зрения по Гольдману, тест поля зрения по Хамфри, микропериметрию, диаграммы Пелли-Робсона, карту SKILL, цветные пластины Ишихары, цветовой тест Фарнsworthа D15 или D100, стандартную электроретинографию,

мультифокальную электроретинографию, валидированные тесты на скорость чтения, распознавание лиц, симуляцию вождения и сообщаемую пациентом степень удовлетворенности. Таким образом, можно сказать, что лечение заболевания сосудов и/или макулярного отека достигается при увеличении на 2 или более строки (или 10 букв) или отсутствии их потери при оценке зрения по шкале ETDRS. Кроме того, можно сказать, что происходит лечение заболевания сосудов и/или макулярного отека, когда у субъекта наблюдается по меньшей мере 10% увеличение или отсутствие 10% уменьшения скорости чтения (слов в минуту). Кроме того, можно сказать, что происходит лечение заболевания сосудов и/или макулярного отека, когда у субъекта наблюдается по меньшей мере 20% увеличение или отсутствие 20% уменьшения доли правильно идентифицированных пластин в тесте Ишихары или правильно упорядоченных дисков в тесте Фарнворта. Дополнительно, можно сказать, что происходит лечение заболевания сосудов сетчатки и/или макулярного отека, если субъект характеризуется, например, по меньшей мере 10% уменьшением или отсутствием увеличения на величину, составляющую 10% или больше, времени до заранее заданной степени адаптации к темноте. Кроме того, можно сказать, что происходит лечение заболевания сосудов сетчатки и/или макулярного отека, когда у субъекта наблюдается, например, по меньшей мере 10% уменьшение или отсутствие увеличения на величину, составляющую 10% или больше, общей площади зрительной скотомы, выраженной в виде зрительного угла, определенного квалифицированным специалистом, работающим в сфере здравоохранения (т. е. офтальмологом).

[554] Нежелательные аспекты анатомической структуры сетчатки, которые можно подвергать лечению или предупреждению, включают, например, микроаневризму, макулярный отек, ватоподобное пятно, интравитреальную микрососудистую аномалию (IRMA), закупорку капилляров, адгезию лейкоцитов, ишемию сетчатки, неоваскуляризацию головки зрительного нерва, неоваскуляризацию заднего полюса глазного яблока, неоваскуляризацию радужной оболочки, внутривитреальное кровоизлияние, кровоизлияние в стекловидное тело, макулярный рубец, субретинальный фиброз и ретинальный фиброз, расширение вен, извилистость сосудов, утечку жидкости из сосудов. Таким образом, лечение, например, макулярного отека может быть определено по уменьшению толщины центрального субполя сетчатки на величину, составляющую 20% или больше, измеренному посредством оптической когерентной томографии.

[555] Примеры средств оценки анатомической структуры сетчатки глаза включают фундоскопию, фотографию глазного дна, ангиографию с применением флуоресцеина, ангиографию с индоцианиновым зеленым, оптическую когерентную томографию (ОСТ), спектральную оптическую когерентную томографию, сканирующую лазерную офтальмоскопию, конфокальную микроскопию, адаптивную оптическую систему, автофлуоресцентную визуализацию глазного дна, биопсию, некропсию и иммуногистохимию. Таким образом, можно сказать, что заболевание сосудов и/или

макулярный отек подвергаются лечению у субъекта при 10% уменьшении площади, охватывающей область утечки, определенной посредством флуоресцентной ангиографии. Субъектам, подлежащим лечению терапевтическими средствами по настоящему изобретению, также можно вводить другие терапевтические средства посредством известных способов лечения состояний, ассоциированных с сахарным диабетом, такие как все формы инсулина и антигипертензивные лекарственные препараты.

[556] Лечение и/или предупреждение заболевания глаз, такого как макулярный отек, DME, AMD, например неоваскулярная AMD, окклюзия вен сетчатки (RVO), ангионевротический отек, мультифокальный хориоидит, миопическая хориоидальная неоваскуляризация и/или ретинопатия недоношенных, может быть определено офтальмологом или работником сферы здравоохранения с применением клинически значимых измерений зрительной функции и/или анатомической структуры сетчатки посредством любого из показателей, описанных на всем протяжении данного документа. Хотя показатели, описанные в данном документе, не применяются ко всем и каждому заболеванию глаз в данном документе, специалист в данной области отличит клинически уместное измерение зрительной функции и/или анатомической структуры сетчатки, которое можно применять для лечения данного заболевания глаз.

[557] Если антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению вводят вместе с другим средством, они оба могут быть введены последовательно в любом порядке или одновременно. В некоторых аспектах антитело к ВТС или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению вводят субъекту, который также получает терапию вторым средством (например, Beovu/бролуцизумабом, Lucentis/ранибизумабом, Avastin/бевицизумабом, Eylea/афлиберцептом, пэгаптанибом, пазопанибом, сорафинибом, сунитинибом и рапамицином). Схема комбинированной терапии может быть аддитивной, или она может обеспечивать синергетические результаты (например, снижение показателей тяжести ретинопатии на уровне, превышающем ожидаемый, в случае комбинированного применения двух средств).

[558] Более того, настоящее изобретение относится к способу лечения нарушения (например, нарушение со стороны глаз) путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества терапевтической молекулы, конъюгированной со связывающей функциональной единицей на основе антитела к ВТС. Предполагается, что молекулы конъюгированы со связывающими функциональными единицами на основе антитела к ВТС, которые связывают ВТС в тканях глаза с КД, составляющей 100 мкМ или меньше. Например, связывающие функциональные единицы на основе антитела к ВТС могут связывать ВТС с КД, составляющей 50 мкМ, 40 мкМ, 30 мкМ, 20 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ, 4 мкМ, 3 мкМ, 2 мкМ, 1 мкМ, 0,5 мкМ, 0,1 мкМ, 0,05 мкМ, 0,01 мкМ или 0,005 мкМ или меньше. В одном аспекте молекула конъюгирована со связывающей функциональной единицей на основе антитела к ВТС, которая связывает ВТС с КД, составляющей 100,0 мкМ или меньше. В одном аспекте молекула конъюгирована со связывающей

функциональной единицей на основе антитела к ВТС, которая связывает ВТС с КD, составляющей 10 мкМ или меньше. В одном аспекте молекула, конъюгированная со связывающей функциональной единицей на основе антитела к ВТС, содержит связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС, которая связывает ВТС с КD, составляющей 5,0 мкМ или меньше. В одном аспекте молекула, конъюгированная с антителом к ВТС или его функциональным фрагментом, содержит связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС, которая связывает ВТС с КD, составляющей 1,0 мкМ или меньше. В дополнительном аспекте вышеуказанные способы дополнительно включают перед стадией введения стадию проведения диагностики субъекта с таким состоянием или нарушением.

Введение доз

[559] Выбор схемы введения для терапевтического средства зависит от нескольких факторов, в том числе скорости метаболизма объекта в сыворотке крови или ткани, уровня выраженности признаков или симптомов, иммуногенности объекта и доступности клеток-мишеней в биологической матрице. В определенных аспектах схема введения обеспечивает увеличение до максимума количества терапевтического средства, доставляемого пациенту, в соответствии с приемлемым уровнем побочных эффектов.

[560] Доза и частота введения могут меняться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Введение связывающей функциональной единицы на основе антитела к ВТС и/или мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанной в данном документе, приводит к клинически значимому улучшению в отношении дозы и частоты введения доз, например, уменьшенной дозировке и/или уменьшенной частоте введения доз. Достижение клинически значимого улучшения в отношении дозы и частоты введения доз может варьироваться в зависимости от исходной начальной дозы композиции.

[561] Композицию на основе мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанной в данном документе, можно вводить в рамках нескольких случаев введения. Интервалы между однократными дозами могут составлять неделю или месяц. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает необходимость повторного лечения пациента, например, исходя из показателей остроты зрения или активности заболевания. Кроме этого, альтернативные интервалы введения доз могут быть определены врачом, и их можно вводить ежемесячно или по мере необходимости для обеспечения эффективности.

[562] В одном аспекте эффективность мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанной в данном документе, например NVS11, в лечении заболевания глаз, например макулярного

отека, DME, AMD, неоваскулярной AMD и/или RVO, основана на снижении толщины центральной области сетчатки (CRT, в мкм), например, измеренном с помощью спектральной оптической когерентной томографии субполя (SD-OCT) по шкале ETDRS. В другом аспекте эффективность мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к BCS и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанной в данном документе, например NVS11, в лечении заболевания глаза, например макулярного отека, DME, AMD, неоваскулярной AMD и/или RVO, основана на улучшении остроты зрения с максимальной коррекцией (BCVA), например, измеренном с помощью букв.

[563] Дозировка и частота введения могут варьироваться в зависимости от, например, того, является лечение профилактическим или терапевтическим, и на них оказывает влияние период полувыведения вводимой молекулы. Введение молекул, описанных в данном документе, приводит к клинически значимому улучшению в отношении дозы и частоты введения доз. Например, дозу молекул можно вводить с более низкой частотой по сравнению с неконъюгированными молекулами. Достижение клинически значимого улучшения в отношении дозы и частоты введения доз может варьироваться в зависимости от исходной начальной дозы композиции.

[564] Эффективное количество для конкретного пациента может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние, лечение которого осуществляют, общее состояние здоровья пациента, путь введения и вводимая доза согласно способу и тяжесть побочных эффектов (см., например, Maynard, et al. (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK).

[565] В данном документе описан способ предупреждения или лечения заболевания глаз, например макулярного отека, DME, AMD, неоваскулярной AMD или RVO, включающий интравитреальное введение мультиспецифической связывающей молекулы, содержащей связывающую функциональную единицу на основе антитела к BCS и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанной в данном документе, в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,25 до 7,5 мг/глаз или от приблизительно 7,5 до 15 мг/глаз, например в дозе, составляющей 0,25 мг/глаз, 0,75 мг/глаз, 2,5 мг/глаз или 7,5 мг/глаз; или в дозе, составляющей 8 мг/глаз, 8,5 мг/глаз, 9 мг/глаз, 9,5 мг/глаз, 10 мг/глаз, 10,5 мг/глаз, 11 мг/глаз, 11,5 мг/глаз, 12 мг/глаз, 12,5 мг/глаз, 13 мг/глаз, 13,5 мг/глаз, 14 мг/глаз, 14,5 мг/глаз или 15 мг/глаз. Иллюстративная схема лечения предусматривает интравитреальное введение один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 3 месяца, один раз в 4 месяца, один раз в 5 месяцев, один раз в 6 месяцев или по мере необходимости (PRN). В одном аспекте 7,5 мг/глаз представляет собой максимально возможную дозу. В другом аспекте 7,5 мг/глаз представляет собой максимально возможную безопасную дозу.

[566] В одном аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к BCS и

связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе, можно вводить, например, интравитреально в дозе, составляющей 0,25 мг/глаз, 0,3 мг/глаз, 0,35 мг/глаз, 0,4 мг/глаз, 0,45 мг/глаз, 0,5 мг/глаз, 0,55 мг/глаз, 0,6 мг/глаз, 0,65 мг/глаз, 0,7 мг/глаз, 0,75 мг/глаз, 0,8 мг/глаз, 0,85 мг/глаз, 0,9 мг/глаз, 0,95 мг/глаз, 1,0 мг/глаз, 1,1 мг/глаз, 1,2 мг/глаз, 1,3 мг/глаз, 1,4 мг/глаз, 1,5 мг/глаз, 1,6 мг/глаз, 1,7 мг/глаз, 1,8 мг/глаз, 1,9 мг/глаз, 2,0 мг/глаз, 2,1 мг/глаз, 2,2 мг/глаз, 2,3 мг/глаз, 2,4 мг/глаз, 2,5 мг/глаз, 2,6 мг/глаз, 2,7 мг/глаз, 2,8 мг/глаз, 2,9 мг/глаз, 3,0 мг/глаз, 3,1 мг/глаз, 3,2 мг/глаз, 3,3 мг/глаз, 3,4 мг/глаз, 3,5 мг/глаз, 3,6 мг/глаз, 3,7 мг/глаз, 3,8 мг/глаз, 3,9 мг/глаз, 4,0 мг/глаз, 4,1 мг/глаз, 4,2 мг/глаз, 4,3 мг/глаз, 4,4 мг/глаз, 4,5 мг/глаз, 4,6 мг/глаз, 4,7 мг/глаз, 4,8 мг/глаз, 4,9 мг/глаз, 5,0 мг/глаз, 5,1 мг/глаз, 5,2 мг/глаз, 5,3 мг/глаз, 5,4 мг/глаз, 5,5 мг/глаз, 5,6 мг/глаз, 5,7 мг/глаз, 5,8 мг/глаз, 5,9 мг/глаз, 6,0 мг/глаз, 6,1 мг/глаз, 6,2 мг/глаз, 6,3 мг/глаз, 6,4 мг/глаз, 6,5 мг/глаз, 6,6 мг/глаз, 6,7 мг/глаз, 6,8 мг/глаз, 6,9 мг/глаз, 7,0 мг/глаз, 7,1 мг/глаз, 7,2 мг/глаз, 7,3 мг/глаз, 7,4 мг/глаз или 7,5 мг/глаз.

[567] В другом аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе, можно вводить, например, интравитреально в дозе от 0,25 до 0,75 мг/глаз, от 0,3 до 0,75 мг/глаз, от 0,35 до 0,75 мг/глаз, от 0,4 до 0,75 мг/глаз, от 0,45 до 0,75 мг/глаз, от 0,5 до 0,75 мг/глаз, от 0,55 до 0,75 мг/глаз, от 0,6 до 0,75 мг/глаз, от 0,65 до 0,75 мг/глаз, от 0,7 до 0,75 мг/глаз, от 0,25 до 0,7 мг/глаз, от 0,25 до 0,65 мг/глаз, от 0,25 до 0,6 мг/глаз, от 0,25 до 0,55 мг/глаз, от 0,25 до 0,5 мг/глаз, от 0,25 до 0,45 мг/глаз, от 0,25 до 0,4 мг/глаз, от 0,25 до 0,35 мг/глаз, от 0,25 до 0,3 мг/глаз, от 0,3 до 0,7 мг/глаз, от 0,35 до 0,65 мг/глаз, от 0,4 до 0,6 мг/глаз, от 0,45 до 0,55 мг/глаз, от 0,35 до 0,45 мг/глаз, от 0,45 до 0,55 мг/глаз или от 0,55 до 0,65 мг/глаз.

[568] В другом аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе, можно вводить, например, интравитреально в дозе от 0,75 до 2,5 мг/глаз, от 0,8 до 2,5 мг/глаз, от 0,85 до 2,5 мг/глаз, от 0,9 до 2,5 мг/глаз, от 0,95 до 2,5 мг/глаз, от 1 до 2,5 мг/глаз, от 1,25 до 2,5 мг/глаз, от 1,5 до 2,5 мг/глаз, от 1,75 до 2,5 мг/глаз, от 2 до 2,5 мг/глаз, от 2,25 до 2,5 мг/глаз, от 0,75 до 2,25 мг/глаз, от 0,75 до 2 мг/глаз, от 0,75 до 1,75 мг/глаз, от 0,75 до 1,5 мг/глаз, от 0,75 до 1,25 мг/глаз, от 0,75 до 1 мг/глаз, от 0,8 до 2,25 мг/глаз, от 0,85 до 2 мг/глаз, от 0,9 до 1,75 мг/глаз, от 0,95 до 1,5 мг/глаз, от 1 до 1,25 мг/глаз, от 0,8 до 0,9 мг/глаз, от 0,9 до 1 мг/глаз, от 1 до 1,25 мг/глаз, от 1,25 до 1,5 мг/глаз, от 1,5 до 1,75 мг/глаз, от 1,75 до 2 мг/глаз, от 2 до 2,25 мг/глаз или от 2,25 до 2,5 мг/глаз.

[569] В одном аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе, можно вводить, например, интравитреально в дозе от 2,5 до 7,5

мг/глаз, от 2,75 до 7,5 мг/глаз, от 3 до 7,5 мг/глаз, от 3,25 до 7,5 мг/глаз, от 3,5 до 7,5 мг/глаз, от 3,75 до 7,5 мг/глаз, от 4 до 7,5 мг/глаз, от 4,25 до 7,5 мг/глаз, от 4,5 до 7,5 мг/глаз, от 4,75 до 7,5 мг/глаз, от 5 до 7,5 мг/глаз, от 5,25 до 7,5 мг/глаз, от 5,5 до 7,5 мг/глаз, от 5,75 до 7,5 мг/глаз, от 6 до 7,5 мг/глаз, от 6,25 до 7,5 мг/глаз, от 6,5 до 7,5 мг/глаз, от 6,75 до 7,5 мг/глаз, от 7 до 7,5 мг/глаз, от 7,25 до 7,5 мг/глаз, от 2,5 до 7,25 мг/глаз, от 2,5 до 7 мг/глаз, от 2,5 до 6,75 мг/глаз, от 2,5 до 6,5 мг/глаз, от 2,5 до 6,25 мг/глаз, от 2,5 до 6 мг/глаз, от 2,5 до 5,75 мг/глаз, от 2,5 до 5,5 мг/глаз, от 2,5 до 5,25 мг/глаз, от 2,5 до 5 мг/глаз, от 2,5 до 4,75 мг/глаз, от 2,5 до 4,5 мг/глаз, от 2,5 до 4,25 мг/глаз, от 2,5 до 4 мг/глаз, от 2,5 до 3,75 мг/глаз, от 2,5 до 3,5 мг/глаз, от 2,5 до 3,25 мг/глаз, от 2,5 до 3 мг/глаз, от 2,5 до 2,75 мг/глаз, от 2,75 до 7,25 мг/глаз, от 3 до 7 мг/глаз, от 3,25 до 6,75 мг/глаз, от 3,5 до 6,5 мг/глаз, от 3,75 до 6,25 мг/глаз, от 4 до 6 мг/глаз, от 4,25 до 5,75 мг/глаз, от 4,5 до 5,5 мг/глаз, от 4,75 до 5,25 мг/глаз, от 2,75 до 3 мг/глаз, от 3 до 3,25 мг/глаз, от 3,25 до 3,5 мг/глаз, от 3,5 до 3,75 мг/глаз, от 3,75 до 4 мг/глаз, от 4 до 4,25 мг/глаз, от 4,25 до 4,5 мг/глаз, от 4,5 до 4,75 мг/глаз, от 4,75 до 5 мг/глаз, от 5 до 5,25 мг/глаз, от 5,25 до 5,5 мг/глаз, от 5,5 до 5,75 мг/глаз, от 5,75 до 6 мг/глаз, от 6 до 6,25 мг/глаз, от 6,25 до 6,5 мг/глаз, от 6,5 до 6,75 мг/глаз, от 6,75 до 7 мг/глаз, от 7 до 7,25 мг/глаз или от 7,25 до 7,5 мг/глаз.

[570] В одном аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе, можно вводить, например, интравитреально в дозе от 7,5 до 15 мг/глаз, от 8 до 15 мг/глаз, от 8,5 до 15 мг/глаз, от 9 до 15 мг/глаз, от 9,5 до 15 мг/глаз, от 10 до 15 мг/глаз, от 10,5 до 15 мг/глаз, от 11 до 15 мг/глаз, от 11,5 до 15 мг/глаз, от 12 до 15 мг/глаз, от 12,5 до 15 мг/глаз, от 13 до 15 мг/глаз, от 13,5 до 15 мг/глаз, от 14 до 15 мг/глаз, от 14,5 до 15 мг/глаз, от 7,5 до 14,5 мг/глаз, от 7,5 до 14 мг/глаз, от 7,5 до 13,5 мг/глаз, от 7,5 до 13 мг/глаз, от 7,5 до 12,5 мг/глаз, от 7,5 до 12 мг/глаз, от 7,5 до 11,5 мг/глаз, от 7,5 до 11 мг/глаз, от 7,5 до 10,5 мг/глаз, от 7,5 до 10 мг/глаз, от 7,5 до 9,5 мг/глаз, от 7,5 до 9 мг/глаз, от 7,5 до 8,5 мг/глаз, от 7,5 до 8 мг/глаз, от 8 до 14,5 мг/глаз, от 8,5 до 14 мг/глаз, от 9 до 13,5 мг/глаз, от 9,5 до 13 мг/глаз, от 10 до 12,5 мг/глаз, от 10,5 до 12 мг/глаз, от 11 до 11,5 мг/глаз, от 8 до 8,5 мг/глаз, от 8,5 до 9 мг/глаз, от 9 до 9,5 мг/глаз, от 9,5 до 10 мг/глаз, от 10 до 10,5 мг/глаз, от 10,5 до 11 мг/глаз, от 11 до 11,5 мг/глаз, от 11,5 до 12 мг/глаз, от 12 до 12,5 мг/глаз, от 12,5 до 13 мг/глаз, от 13 до 13,5 мг/глаз, от 13,5 до 14 мг/глаз, от 14 до 14,5 мг/глаз или от 14,5 до 15 мг/глаз.

[571] В определенном аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе (например, описанная в таблице 3, такая как NVS11 или антитело, содержащее LCDR и HCDR NVS11), для применения в способах, представленных в данном документе (например, способах предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, например неоваскулярной AMD, и/или RVO), вводят, например, путем

интравитреального введения в дозе, составляющей 0,25 мг/глаз.

[572] В другом аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе (например, описанная в таблице 3, такая как NVS11 или антитело, содержащее LCDR и HCDR NVS11), для применения в способах, представленных в данном документе (например, способах предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, например неоваскулярной AMD, и/или RVO), вводят, например, путем интравитреального введения в дозе, составляющей 0,75 мг/глаз.

[573] В другом аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе (например, описанная в таблице 3, такая как NVS11 или антитело, содержащее LCDR и HCDR NVS11), для применения в способах, представленных в данном документе (например, способах предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, например неоваскулярной AMD, и/или RVO), вводят, например, путем интравитреального введения в дозе, составляющей 1 мг/глаз.

[574] В другом аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе (например, описанная в таблице 3, такая как NVS11 или антитело, содержащее LCDR и HCDR NVS11), для применения в способах, представленных в данном документе (например, способах предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, например неоваскулярной AMD, и/или RVO), вводят, например, путем интравитреального введения в дозе, составляющей 1,5 мг/глаз.

[575] В другом аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе (например, описанная в таблице 3, такая как NVS11 или антитело, содержащее LCDR и HCDR NVS11), для применения в способах, представленных в данном документе (например, способах предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, например неоваскулярной AMD, и/или RVO), вводят, например, путем интравитреального введения в дозе, составляющей 2 мг/глаз.

[576] В другом аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе (например, описанная в таблице 3, такая как NVS11 или антитело, содержащее LCDR и HCDR NVS11), для применения в способах, представленных в данном документе (например, способах предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, например неоваскулярной AMD, и/или RVO), вводят, например, путем

интравитреального введения в дозе, составляющей 2,5 мг/глаз.

[577] В другом аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе (например, описанная в таблице 3, такая как NVS11 или антитело, содержащее LCDR и HCDR NVS11), для применения в способах, представленных в данном документе (например, способах предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, например неоваскулярной AMD, и/или RVO), вводят, например, путем интравитреального введения в дозе, составляющей 3 мг/глаз.

[578] В другом аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе (например, описанная в таблице 3, такая как NVS11 или антитело, содержащее LCDR и HCDR NVS11), для применения в способах, представленных в данном документе (например, способах предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, например неоваскулярной AMD, и/или RVO), вводят, например, путем интравитреального введения в дозе, составляющей 5 мг/глаз.

[579] В другом аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе (например, описанная в таблице 3, такая как NVS11 или антитело, содержащее LCDR и HCDR NVS11), для применения в способах, представленных в данном документе (например, способах предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, например неоваскулярной AMD, и/или RVO), вводят, например, путем интравитреального введения в дозе, составляющей 7,5 мг/глаз.

[580] В другом аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе (например, описанная в таблице 3, такая как NVS11 или антитело, содержащее LCDR и HCDR NVS11), для применения в способах, представленных в данном документе (например, способах предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, например неоваскулярной AMD, и/или RVO), вводят, например, путем интравитреального введения в дозе, составляющей 10 мг/глаз.

[581] В другом аспекте мультиспецифическую связывающую молекулу, содержащую связывающую функциональную единицу на основе антитела к BTC и связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, описанную в данном документе (например, описанная в таблице 3, такая как NVS11 или антитело, содержащее LCDR и HCDR NVS11), для применения в способах, представленных в данном документе (например, способах предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, например неоваскулярной AMD, и/или RVO), вводят, например, путем

интравитреального введения в дозе, составляющей 15 мг/глаз.

[582] В данном документе описан способ предупреждения или лечения заболевания глаз, например макулярного отека, DME, AMD, неоваскулярной AMD или RVO, включающий интравитреальное введение антитела к ВТС, описанного в данном документе, например NVS1, в дозировке, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,125 до 3,75 мг/глаз или от приблизительно 3,75 до 7,5 мг/глаз, например в дозе, составляющей 0,125 мг/глаз, 0,375 мг/глаз, 1,25 мг/глаз или 3,75 мг/глаз; или в дозе, составляющей 4 мг/глаз, 4,25 мг/глаз, 4,5 мг/глаз, 4,75 мг/глаз, 5 мг/глаз, 5,25 мг/глаз, 5,5 мг/глаз, 5,75 мг/глаз, 6 мг/глаз, 6,25 мг/глаз, 6,5 мг/глаз, 6,75 мг/глаз, 7 мг/глаз, 7,25 мг/глаз или 7,5 мг/глаз. Иллюстративная схема лечения предусматривает интравитреальное введение один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 3 месяца, один раз в 4 месяца, один раз в 5 месяцев, один раз в 6 месяцев или по мере необходимости (PRN).

[583] В данном документе описаны различные (пронумерованные) аспекты настоящего изобретения. Следует понимать, что признаки, указанные в каждом аспекте, можно объединять с другими указанными признаками с получением дополнительных аспектов настоящего изобретения. Если аспект описан как находящийся "в соответствии с" предыдущим аспектом, предыдущий аспект включает его подаспекты. Содержание любых патентов, заявок на выдачу патентов и ссылок, цитируемых во всем данном описании, тем самым включено посредством ссылки во всей своей полноте. Если контекст не требует иного, термины в единственном числе, используемые в данном документе, будут включать множественное число, а термины во множественном числе будут включать единственное число.

Примеры

[584] Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как дополнительно ограничивающие.

Пример 1. Скрининг антител к ВТС с созревшей аффинностью

[585] Fab к ВТС выделяли *in vitro* с применением технологии MorphoSys' HuCAL[®] (комбинаторная библиотека человеческих антител), где очищенные антигены бетацеллюлина человека и мыши применяли для идентификации специфических связывающих антител к ВТС.

[586] Полностью человеческую библиотеку фагового дисплея применяли для получения бетацеллюлин-связывающих антител, описанных в данном документе. Биотинилированный и небитинилированный бетацеллюлин человека и яванского макака применяли в процедурах твердофазного пэннинга и пэннинга в растворе. Проводили стандартный пэннинг, а также использовали подходы RapMAT (Prassler et al., (2009) *Immunotherapy* 1(4):571-583). После вторичного скрининга и пэннинга RapMAT отбирали клоны для анализа последовательности и набор из четырех антител отбирали для преобразования в формат FabCys, приведения к последовательности зародышевого типа, оптимизации pI и удаления сайтов дезамидирования. Получение FabCys осуществляли

посредством запатентованного способа RapCLONE®. RapCLONE® проводили в виде двухстадийного способа для удобного и эффективного преобразования большого количества клонов Fab в формат IgG и FabCys. На первой стадии клонирования эукариотическую кассету экспрессии встраивали в векторы экспрессии pMORPH®x11 (для HuCAL PLATINUM®) посредством расщепления с помощью BsiWI/MfeI (для пулов K) или HpaI/MfeI (для пулов λ) и последующего лигирования. После этого следовала вторая стадия клонирования, в которой пулы Fab, содержащие кассету экспрессии, расщепляли с применением EcoRV/BlnI (пулы κ и λ) и затем клонировали в акцепторный вектор pMorph®4_IgG1f или pMorph®4_h_FabCys для экспрессии в клетках млекопитающих. Для данного проекта RapCLONE® применяли только в отношении уникального, секвенированного и охарактеризованного Fab. Следовательно, после RapCLONE® все клоны были восстановлены.

[587] В следующих разделах приведены дополнительные детали скрининга антител к ВТС с созревшей аффинностью.

Твердофазный пэннинг в отношении бетацеллюлина

[588] Фагмидную библиотеку HuCAL® (Knappik et al., J Mol Biol 296, 57-86, 2000) применяли наряду с технологией CysDisplay™ для представления Fab на поверхности фага (Lohning, 2001 WO 01/05950).

[589] 96-луночные планшеты Maxisorp™ покрывали 300 мкл антигена (растворимого, обработанного) разновидностей бетацеллюлина o/n (в течение ночи) при 4°C. Покрытые лунки блокировали с помощью PBS (фосфатно-солевого буферного раствора)/5% молочного порошка. Для каждой процедуры пэннинга приблизительно 4×10^{13} антител на фаге, полученных с применением HuCAL Platinum®, блокировали равным объемом смеси PBS/0,05% Tween20/5% молочный порошок/5% BSA (бычий сывороточный альбумин). В ходе блокирования фага дополнительными блокирующими реагентами покрывали планшет Maxisorp™ и блокированные препараты фага дополнительно предварительно очищали на покрытых реагентах, чтобы избежать отбора антител против метки антигена. После процедуры блокирования 300 мкл смеси предварительно блокированного фага добавляли в каждую покрытую антигеном и блокированную лунку и инкубировали в течение 2 ч (часов) при к. т. (комнатной температуре) на шейкере для титрационных микропланшетов. После этого неспецифически связанный фаг смывали посредством нескольких стадий промывания с применением сначала PBS/0,05% Tween20, а затем PBS. Для элюирования специфически связанного фага добавляли 300 мкл 25 mM DTT (дитиотреитола) в 10 mM Трис/HCl (хлористоводородной кислоте) с pH 8 на лунку в течение 10 мин при к. т. Элюат с DTT переносили в 14 мл TG1 E. coli, который выращивали до OD (оптической плотности)₆₀₀, составляющей 0,6-0,8. Смесь TG1 E. coli (Escherichia coli) и элюата с DTT инкубировали в течение 45 мин (минут) на водяной бане при 37°C (Цельсия) для инфицирования фагом. Осадки бактерий ресуспендировали в среде 2xYT (триптон из дрожжевого экстракта), высевали на чашки с агаром LB/Cam (хлорамфеникол) и инкубировали в течение ночи при

30°C. Колонии соскребали с чашек и применяли для высвобождения фага, поликлональной амплификации выбранных клонов и получения фага. При наличии очищенного фага начинали следующий цикл пэннинга.

[590] Второй и третий циклы твердофазного пэннинга проводили в соответствии с протоколом первого цикла, за исключением более строгих условий промывания.

Пэннинг в растворе в отношении бетацеллюлина

[591] Необходимым условием для пэннинга в растворе было биотинилирование антигена и подтверждение сохраняющейся активности биотинилированного антигена. В ходе пэннинга в растворе фаг, на котором представлен Fab, и биотинилированный антиген инкубировали в растворе, что облегчало доступ фага к антигену.

Протокол пэннинга в растворе с магнитными гранулами, связанными со стрептавидином

[592] На весь пул фага 4 мг гранул со стрептавидином (Dynabeads[®] M-280 со стрептавидином; Invitrogen) блокировали в 1x Chemiblocker. Параллельно для каждой процедуры пэннинга приблизительно 4×10^{13} антител на фаге, полученных с применением NuCAL PLATINUM[®], блокировали равным объемом 2 x Chemiblocker/0,1% Tween20. Для удаления фага, связывающегося с гранулами, два раза проводили предварительную адсорбцию заблокированных фаговых частиц с применением 1 мг заблокированных гранул со стрептавидином для каждой процедуры адсорбции. Для того, чтобы избежать отбора антител против биотина, 1 мг гранул со стрептавидином на субкод и цикл отбора покрывали нерелевантным биотинилированным антигеном, который применяли для предварительной адсорбции фага. В ходе блокирования фага дополнительные небитинилированные реагенты для блокирования добавляли в блокирующий буфер, чтобы избежать отбора антител против метки (например, нерелевантного антигена FLAG_6xHis). Затем биотинилированные разновидности бетацеллюлина (например, 100 нМ) добавляли к предварительно адсорбированным и заблокированным фаговым частицам и инкубировали в течение 1-2 часов при к. т. на ротаторе. Комплексы фаг-антиген захватывали с применением 2 мг заблокированных гранул со стрептавидином и фаговые частицы, связанные с гранулами со стрептавидином, собирали с помощью магнитного сепаратора. Неспецифически связанный фаг смывали посредством нескольких стадий промывания с применением PBS/0,05% Tween20 и PBS. Для элюирования специфически связанного фага с гранул со стрептавидином добавляли 200 мкл 25 мМ DTT в 10 мМ Трис/HCl с pH 8 на лунку в течение 10 мин при к. т. Элюат с DTT затем переносили в 14 мл TG1 E. coli, который выращивали до OD₆₀₀, составляющей 0,6-0,8. Смесь TG1 и элюата с DTT инкубировали в течение 45 мин на водяной бане при 37°C для инфицирования фагом. Осадки бактерий ресуспендировали в среде 2xYT, высевали на чашки с агаром LB/Sam и инкубировали в течение ночи при 30°C. Колонии соскребали с чашек и применяли для высвобождения фага, поликлональной амплификации выбранных клонов и получения фага. При наличии очищенного фага начинали следующий цикл пэннинга. Второй и третий циклы пэннинга в растворе проводили в соответствии с протоколом

первого цикла, за исключением сниженных количеств антигена и более строгих условий промывания. В одной стратегии проводили процедуры отбора по скорости диссоциации (Hawkins et al., J Mol Biol 226, 889-896, 1992) в 3-ем цикле пэннинга.

Скрининг Fab-содержащих бактериальных лизатов для ELISA (связывание, эффективность) и FACS-скрининг

[593] 5 мкл каждой культуры, инкубированной в течение ночи, переносили в стерильный 384-луночный титрационный микропланшет, предварительно заполненный 40 мкл среды 2xYT (34 мкг/мл хлорамфеникола (Cam); 0,1% глюкозы) на лунку. Планшеты инкубировали при 37°C до тех пор, пока культуры не становились слегка мутными. В эти планшеты для экспрессии добавляли 10 мкл среды 2xYT (34 мкг/мл Cam и 2,5-5 мМ IPTG) на лунку. Планшеты накрывали газопроницаемой лентой и инкубировали в течение ночи при 22°C. В каждую лунку планшетов для экспрессии добавляли 15 мкл буфера BEL (2,5 мг/мл лизоцима, 4 мМ EDTA, 10 ед./мкл бензоназы) и планшеты инкубировали в течение 1 ч. Fab-содержащие лизаты *E. coli* применяли для целей скрининга. Способ незначительно модифицировали для FACS-скрининга

Субклонирование Fab-фрагментов, полученных с применением NuCAL PLATINUM[®]

[594] Для обеспечения быстрой экспрессии растворимого Fab вставки, кодирующие Fab, в отобранном фаге NuCAL PLATINUM[®] субклонировали из дисплейного вектора pMORPH[®]30 в вектор экспрессии pMORPH[®]x11, представляющий собой pMORPH[®]x11_FH. Субклонирование проводили посредством тройного расщепления с помощью EcoRI/XbaI/BmtI. После трансформации TG1-F⁻ *E. coli* экспрессию отдельных клонов и получение периплазматических экстрактов, содержащих фрагменты NuCAL[®]-Fab, проводили как описано ранее (Rauchenberger et al., J Biol Chem 278, 38194-38205, 2003).

Получение "мастер-планшетов"

[595] Отдельные клоны, устойчивые к хлорамфениколу, собирали в лунки стерильного 384-луночного планшета для микротитрования, предварительно заполненные 60 мкл среды 2xYT-CG (34 мкг/мл хлорамфеникола (Cam); 0,1% глюкозы), и выращивали в течение ночи при 37°C. На следующее утро 100 мкл стерильной среды 2xYT, содержащей 30% глицерина, добавляли в каждую лунку "мастер-планшетов"; планшеты накрывали алюминиевой фольгой и хранили при -80°C.

[596] В следующих двух разделах описано получение лизатов из Fab-экспрессирующих бактерий *E. coli* в 384- и 96-луночном формате соответственно. Такие планшеты для экспрессии позднее применяли для подходов ELISA и/или FACS-скрининга.

Экспрессия и очистка His-меченных Fab-фрагментов в *E. coli* (в масштабе мг)

[597] Экспрессию Fab-фрагментов, кодируемых pMORPH[®]x11_Fab_FH и pYVec10[®]_Fab_FH, в клетках TG1 F⁻ *E. coli* осуществляли в культурах во встряхиваемых колбах с использованием 500 мл 2x среды YT, дополненной 0,1% глюкозой и 34 мкг/мл

хлорамфеникола. Культуры встряхивали при 30°C (pMORPH[®]x11_Fab_FH) или 22°C (pYVex10[®]_Fab_FH) до достижения значения OD₆₀₀, составляющего 0,5. Экспрессию Fab индуцировали посредством добавления IPTG (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид) в конечной концентрации 0,75 mM (pMORPH[®]x11_Fab_FH) или 0,5 mM (pYVex10[®]_Fab_FH) и дополнительного культивирования в течение 20 ч при 30°C (pMORPH[®]x11_Fab_FH) или 22°C (pYVex10[®]_Fab_FH). Клетки собирали и разрушали с применением лизоцима. His₆-меченные Fab-фрагменты выделяли с помощью ИМАС (Bio-Rad, Германия) и элюировали с применением имидазола. Замену буфера на 1x PBS Дульбекко (pH 7,2) проводили с применением колонок PD10 (GE Healthcare, Германия). Образцы подвергали стерилизующей фильтрации (0,2 мкм). Концентрации белков определяли посредством УФ-спектрофотометрии. Чистоту образцов анализировали в 15% геле для SDS-PAGE в денатурирующих невосстанавливающих условиях. Гомогенность препаратов Fab определяли в нативном состоянии посредством эксклюзионной хроматографии (HP-SEC) с калибровочными стандартами.

Преобразование в формат IgG и FabCys млекопитающих

[598] RapCLONE[®] проводили в виде двухстадийного способа для удобного и эффективного преобразования большого количества клонов Fab в формат FabCys. На первой стадии клонирования эукариотическую кассету экспрессии встраивали в вектор экспрессии pMORPH[®]x11 посредством расщепления с помощью BsiWI/MfeI (для пулов κ) или NraI/MfeI (для пулов λ) и последующего лигирования. После этого следовала вторая стадия клонирования, в которой пулы Fab, содержащие кассету экспрессии, расщепляли с применением EcoRV/BlnI (пулы κ и λ) и затем клонировали в акцепторный вектор pMORPH[®]4_FabCys для экспрессии в клетках млекопитающих.

Экспрессия и очистка FabCys человека с применением векторной системы pMORPH[®]4

[599] Эукариотические клетки НКВ11 трансфицировали ДНК-вектором экспрессии pMORPH[®]4 или pYMex, кодирующим как тяжелую, так и легкую цепи FabCys. Надосадочную жидкость культуры клеток собирали в день 3 после трансфекции и подвергали воздействию Capture Select IgG-CH1 (Life Technologies) для очистки FabCys. Если не указано иное, проводили замену буфера на 1x PBS Дульбекко (pH 7,2, Invitrogen) и образцы подвергали стерилизующей фильтрации (размер пор 0,2 мкм). Чистоту FabCys анализировали в денатурирующих, восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с применением CE-SDS (LabChip GXII, Perkin Elmer, США). Концентрации белка определяли посредством УФ-спектрофотометрии и выполняли HP-SEC для анализа препаратов белка в нативном состоянии.

[600] Получали исходные Fab к ВТС. После созревания аффинности (Knappik et al., (2000) J. Mol. Biol., 296:57-86) набор из четырех антител затем выбирали для преобразования в формат Fab с дисульфидными мостиками. Полученные Fab с дисульфидными мостиками обозначены как NVS1, NVS2, NVS3 и NVS4.

[601] Аффинность связывания NVS1-NVS4 с белком ВТС, полученным от

различных видов, измеряли посредством анализа Biacore. Результат представлен в таблице 6 ниже.

Таблица 6. Аффинность связывания NVS1-NVS4 с ВТС

	Biacore/ProteOno (аффинность в пМ)				
	ВТС человека	ВТС мыши	ВТС яванского макака	ВТС крысы	ВТС кролика
NVS1	6	4	8	7	4
NVS2	14	9	16	21	5
NVS3	1,4	< 1	5,4	20	17
NVS4	5	5	12	8	1

[602] В таблице 5 перечислены последовательности исходных вариантов и вариантов с созревшей аффинностью для каждого из NVS1, NVS2, NVS3 и NVS4.

Эпитоп-специфическая сортировка посредством конкурентного ELISA

[603] Для эпитоп-специфической сортировки планшеты Maxisorp покрывали с помощью Fab A при постоянном количестве и тестировали в отношении конкуренции с возрастающими количествами Fab B в растворе. В качестве положительного контроля Fab, который использовали в качестве покрытия, анализировали в отношении конкуренции с ним же в растворе. Все тестируемые Fab инкубировали в 10-кратном молярном избытке с биотинилированным ВТС человека в течение 1 ч при к. т. в растворе. Комплексы антиген-антитело затем добавляли к антителам, которые использовали в качестве покрытия, и выявление связанных комплексов осуществляли с помощью биотинилированного антигена. В целом, сигналы при высокой концентрации Fab можно получить только в том случае, если Fab был способен связываться с доступными эпитопами на антигене, отличным от тестируемого Fab в растворе (т. е. неконкурирующее антитело). Напротив, в случае конкурирующих антител, антител с частично перекрывающимися эпитопами или антител, которые блокируют эпитоп вследствие стерических затруднений, интенсивность сигналов связывания при высокой концентрации Fab значительно снижалась по сравнению с контролями. Соответствующие лунки планшетов Maxisorp покрывали с помощью 20 мкл/лунка Fab при концентрации 1 мкг/мл в PBS, инкубировали в течение ночи при 4°C и затем 3 раза промывали с помощью PBST. Планшеты блокировали с помощью 90 мкл 5% MPBST на лунку в течение 2 ч при к. т. и 3 раза промывали с помощью PBST. Для предварительной инкубации комплекса антиген/антитело антитела к ВТС (Fab B) титровали с шагом 1:3 (начиная с конечной конц. 25 мкг/мл) и инкубировали с конечной конц. 0,6 мкг/мл биотинилированного ВТС в течение 1 ч при к. т. 20 мкл/лунка комплекса ВТС/антитело, подвергнутого предварительной инкубации, добавляли к заблокированным и промытым планшетам Maxisorp и инкубировали в течение 20 мин при к. т. при осторожном встряхивании. Планшеты 3 раза промывали с помощью PBST и инкубировали в течение 1 ч с 20 мкл/лунка комплекса стрептавидин-AP (AbD Serotec, №

по кат. Star6b), разбавленного 1:5000 в 1% BSA/0,05% Tween20/PBS. Планшеты 5 раз промывали с помощью PBST, добавляли 20 мкл раствора AttoPhos (разбавленного 1:10 в ddH₂O) и планшеты подвергали измерению с применением ридера Tecan.

Эпитоп-специфическая сортировка на основе ELISA

[604] Один вариант с созревшей аффинностью на семейство тестировали относительно других представителей в конкурентном ELISA. Созревание аффинности главным образом осуществляли с применением последовательностей, варьирующихся в HCDR3. Каждого тестируемого кандидата (ТС) получали из разных исходных семейств, за исключением того, что ТС12 принадлежит к тому же семейству, что и NVS3, ТС15 и ТС16 принадлежат к тому же семейству, что и NVS2, и ТС23 принадлежит к тому же семейству, что и NVS4. ТС1-ТС8 и ТС10-ТС30 являются кандидатами с созревшей аффинностью, идентифицированными либо из NuCAL, либо из Ylanthia, как описано на протяжении всего данного документа.

[605] Как показано в таблице 7 ниже, были четко идентифицированы одна основная группа эпитопа E и одна небольшая группа эпитопа B (на которую нацеливается только ТС11).

Таблица 7. Сортировка Fab к ВТС с созревшей аффинностью

Таблица 7. Сортировка Fab к ВТС с созревшей аффинностью

		Группа эпитопа E											Группа эпитопа B	
		Предварительно инкубированные с лигандом в растворе												
	Тестируемый кандидат	ТС1	ТС2	ТС3	ТС4	ТС5	ТС6	ТС7	ТС8	NVS1	ТС10	ТС11		
Группа эпитопа E	Нанесены на планшет в виде покрытия	ТС1	N/A	1	1	1	1	1				2		
		ТС2	1	N/A	1	1	1	1				2		
		ТС3	1	1	N/A	1	1	1				3		
		ТС4	1	1	1	N/A	1	1				2		
		ТС5	1	1	1	1	N/A	1				2		
		ТС6	1	1	1	1	1	N/A	1	1	1	1	2	
		ТС7							1	N/A	1	1	1	2
		ТС8							1	1	N/A	1	1	2
		NVS1							1	1	1	N/A	1	2
		ТС10							1	1	1	2	N/A	2
		ТС12							1					2
ТС13							1					2		
ТС14							1					2		
Группа эпитопа B		ТС11	2	2	2	2	2	2	2	2	2	N/A		

1: снижение интенсивности сигнала на > 70%, т. е. одна и та же группа эпитопа

2: снижение интенсивности сигнала на < 30%, т. е. различные группы эпитопа

- 1: снижение интенсивности сигнала на > 70%, т. е. одна и та же группа эпитопа
- 2: снижение интенсивности сигнала на < 30%, т. е. различные группы эпитопа
- 3: снижение интенсивности сигнала на 30-70%, т. е. промежуточная группа эпитопа

Интактный контроль: данные недоступны

Определение характеристик NVS1-NVS4

[607] Четыре кандидата с созревшей аффинностью, NVS1-NVS4, подвергали определению характеристик (например, эффективности и аффинности) в анализах, как представлено в примерах ниже. Результаты представлены в таблице 9 ниже.

Таблица 9. Определение характеристик NVS1-NVS4

Ингибитор вание связывани я по результата м MSD	Ингибитор вание связывани я по результата м		Связыва ние с BTC, заякоре нным в мембра не (медиан ное значени е: X выше 293F)	AD R/ Res pErb B3 (IC5 0 в нМ)	A431 pERK (IC50 в нМ)	MCF1 0A pERK	Эпитопное картирова ние/эпитоп - специфиче ская сортировка (ELISA)	Нейтрал и зация юкстакр инной передачи сигнала		
	BT C/ Erb B1	BT C/ Erb B4							BT C/ Erb B1	BT C/ Erb B4
NV S1	>90 %	>90 %	>90 %	>90 %	>10X	5,7	0,25	99,7	E	89%
NV S2	>90 %	>90 %	>90 %	>90 %	>10X	6,3	0,37	99,7	A	90%
NV S3	>90 %	>90 %	>90 %	>90 %	>10X	7,89	>90%	>90%	E	99%
NV S4	>90 %	>90 %	>90 %	>90 %	>10X	6,1	0,49	99,4	C	87%

Пример 2. Кристаллографический эпитоп антител к BTC

Определение структуры комплексов бетацеллюлин/Fab человека посредством рентгеноструктурного анализа

[608] Определяли кристаллические структуры BTC человека (SEQ ID NO: 157), связанного с четырьмя Fab-фрагментами антител NVS1, NVS2, NVS3 и NVS4. Как подробно показано ниже, Fab-фрагменты экспрессировали и очищали. Нерастворимую зрелую форму BTC, экспрессируемую E. coli, подвергали рефолдингу и очищали.

Очищенные белки BTC и Fab смешивали и полученные комплексы очищали и подвергали кристаллизации. Для определения эпитопа определяли структуру с атомным разрешением BTC, связанного с Fab-фрагментами, с применением рентгеновской кристаллографии.

Получение белка

[609] Последовательности BTC и Fab (NVS1, NVS2, NVS3 и NVS4), полученные для кристаллографии, показаны в таблице 1. Конструкция экспрессии BTC содержит 32-111 остатков (подчеркнуты) белка пробетацеллюлина человека (идентификационный номер в UniProt P35070, SEQ ID NO: 156) наряду с N- и C-концевыми остатками из рекомбинантного вектора экспрессии (показаны строчными буквами, SEQ ID NO: 157). N-концевой стартовый кодон приводит к добавлению аминокислоты MET перед начальным остатком последовательности зрелого BTC. C-конец последовательности зрелого BTC был слит с гексагистидиновой меткой для очистки. В случае Fab (NVS1, NVS2, NVS3 и NVS) последовательности тяжелой и легкой цепей показаны в таблице 10 ниже.

Таблица 10. Белки, применяемые для определения кристаллической структуры

Конструкция	Аминокислотная последовательность в формате однобуквенного кода	SEQ ID NO.
Pro-BTC человека (P35070)	<u>MDRAARCSGASSLPLLLALALGLVILHCVVADGNSTRSP</u> <u>ETNGLLCGDPEENCAATTTQSKRKGHFRCRCPKQYKHYCI</u> <u>KGRCRFVVAEQTPSCVCDEGYIGARCERVDLFYLRGDR</u> GQILVICLIAVMVVFILVIGVCTCCHPLRKRKRKKEE EMETLGKDITPINEDIEETNIA	156
Экспрессируемы й BTC человека	mDGNSTRSPE TNGLLCGDPE ENCAATTTQS KRKGHFRCRCP KQYKHYCIKG RCRFVVAEQT PSCVCDEGYI GARCERVDLF Yhhhhh	157
BTC человека	DGNSTRSPETNGLLCGDPEENCAATTTQSKRKGHFRCRCP KQYKHYCIKGRCRFVVAEQTPSCVCDEGYIGARCERVD LFY	164
Тяжелая цепь Fab NVS2	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQRY YFGFDLWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC	36
Легкая цепь Fab NVS2	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYAYWYQQKP GQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAE DEADYYCQAFDYLYSLGVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT	47

Конструкция	Аминокислотная последовательность в формате однобуквенного кода	SEQ ID NO.
	LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	
Тяжелая цепь Fab NVS3	QVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSGLGHVGYTTYTDSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYLDYFDVWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC	56
Легкая цепь Fab NVS3	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDKIGKKYVHWYQQK PGQAPVLYYDDSDRPSGIPERFSGSNGNTATLTISRAQ AGDEADYYCQAWDMQSVVFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS	67
Тяжелая цепь Fab NVS1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGIVPWMGEAVYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSSSTYGIHAFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC	12
Легкая цепь Fab NVS1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI NFLN WYQQK P GKAPKLLIYAASN LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQYDDFPMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASV VCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	23
Тяжелая цепь Fab NVS4	QVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVR QAPGKGLEWVSYIDSTGTFINYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSLFDYWGQGT LVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC	80

Конструкция	Аминокислотная последовательность в формате однобуквенного кода	SEQ ID NO.
Легкая цепь Fab NVS4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISYLGWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPE DFATYYCQQYDALNTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	90

[610] BTC экспрессировали в штамме BL21(DE3)STAR E. coli (Invitrogen). Через четыре часа индуцирования с помощью 1 mM IPTG при 37°C клетки собирали и лизировали. Нерастворимый осадок 2 раза промывали в 50 mM 2 M мочевины, 100 mM Трис с pH 8,0, 5 mM DTT, 2% Triton X-100 с последующим 1-кратным промыванием с помощью 100 mM Трис с pH 8,0. Промытые тельца включения солибилизировали в 8 M мочеvine, 50 mM фосфате Na с pH 8,0, 0,3 M NaCl с последующим центрифугированием при 15000 x g в течение 10 минут. К надосадочной жидкости добавляли агарозу Ni-NTA (Qiagen), уравновешенную в том же буфере, и смесь вращали при 4°C в течение 1 часа. Смолу собирали в колонке с подачей самотеком, промывали с помощью буфера для уравновешивания с последующим промыванием тем же буфером, содержащим 25 mM имидазола. Белок элюировали тем же буфером, содержащим 300 mM имидазола. К элюату добавляли 0,1 M восстановленный глутатион, затем инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего добавляли 0,5 mM окисленный глутатион. Раствор белка затем подвергали диализу с применением mwco 3500 Да против 5 M мочевины, 100 mM Трис с pH 7,5, 0,5 mM окисленного глутатиона в течение примерно 4 часов при комнатной температуре без покрытия. Диализную трубку затем переносили в 8 л 2,5 M мочевины, 100 mM Трис с pH 7,5, 0,5 mM окисленного глутатиона и подвергали диализу в течение ночи. Диализную трубку затем переносили в 8 л 1 M мочевины, 100 mM Трис с pH 7,5, 0,5 mM окисленного глутатиона и подвергали диализу в течение примерно 4 часов. Осуществляли окончательный перенос в 50 mM Трис с pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,5 mM окисленный глутатион, при этом оставляли для диализа в течение ночи. Диализат фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм для удаления видимого осадка. Белок бетацеллюлин, подвергнутый рефолдингу, концентрировали и наносили на колонку Superdex75 (GE Healthcare Life Sciences), уравновешенную в 25 mM HEPES с pH 7,5, 150 mM NaCl. Фракции, содержащие мономерный BTC_{his}, объединяли.

[611] Комплексы BTC/Fab получали посредством смешивания очищенного BTC с очищенным Fab при молярном соотношении 2:1. Комплекс инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем концентрировали и наносили на колонку Superdex200 (GE Healthcare Life Sciences), уравновешенную в 25 mM HEPES с pH 7,5, 150 mM NaCl. Пиковые фракции анализировали посредством SDS-PAGE и LCMS. Объединяли фракции, содержащие комплекс BTC/Fab.

Кристаллизация и определение структуры

[612] Кристаллы BTC/NVS1 для сбора данных выращивали посредством диффузии паров в сидячей капле при 20°C. Комплекс BTC/NVS1 концентрировали до 7 мг/мл. Кристаллы выращивали посредством смешивания 0,5 мкл комплекса с 0,5 мкл резервуарного раствора, содержащего 27% PEG 4000, 0,17 М сульфата аммония, 5% глицерина, и каплю уравнивали против 1000 мкл того же резервуарного раствора. Перед сбором данных несколько мкл 29% PEG 4000, 12% этиленгликоля, 10% глицерина, 0,17 М сульфата аммония добавляли к капле, содержащей кристалл, затем кристаллы мгновенно охлаждали в жидком азоте.

[613] Кристаллы BTC/NVS2 для сбора данных выращивали посредством диффузии паров в сидячей капле при 4°C. Комплекс BTC/NVS2 концентрировали до примерно 25 мг/мл. Кристаллы выращивали посредством смешивания 150 нл комплекса со 150 нл резервуарного раствора, содержащего 5% PEG 1000, 40% этанола, 0,1 М фосфата/цитрата с pH 4,2, и каплю уравнивали против 40 мкл того же резервуарного раствора. Для сбора данных кристаллы мгновенно охлаждали в жидком азоте.

[614] Кристаллы BTC/NVS3 для сбора данных выращивали посредством диффузии паров в сидячей капле при 4 °C. Комплекс BTC/NVS3 концентрировали до 12 мг/мл. Кристаллы выращивали посредством смешивания 150 нл комплекса со 150 нл резервуарного раствора, содержащего 30% PEG 400, 0,1 М тригидрата ацетата натрия с pH 4,5, 0,2 М гидрата ацетата кальция, и каплю уравнивали против 40 мкл того же резервуарного раствора. Для сбора данных кристаллы мгновенно замораживали в жидком азоте.

[615] Кристаллы BTC/NVS4 для сбора данных выращивали посредством диффузии паров в сидячей капле при 20°C. Комплекс BTC/NVS4 концентрировали до 13 мг/мл. Кристаллы выращивали посредством смешивания 150 нл комплекса со 150 нл резервуарного раствора, содержащего 0,2 М гексагидрата хлорида магния, 0,1 М гидрохлорида Трис с pH 8,5, 20% PEG 8000, и каплю уравнивали против 40 мкл того же резервуарного раствора. Перед сбором данных к капле добавляли несколько мкл 22% PEG 8000, 12% этиленгликоля, 10% глицерина, 0,1 М Трис с pH 8,5, 0,2 М хлорида магния, затем кристаллы мгновенно охлаждали в жидком азоте.

[616] Данные по дифракции собирали в канале синхротронного излучения 17-ID с применением усовершенствованного источника фотонов (Национальная лаборатория Argonne, США). Данные обрабатывали и масштабировали с применением Autoproc (версии 1.1.7. Global Phasing, LTD). Предел разрешения, пространственная группа и размеры элементарной ячейки кратко описаны в таблице 2. Структуру комплексов определяли посредством молекулярного замещения с применением PHENIX (v. 1.12_2829, Adams et. al., (2010) Acta. Cryst. D66:213-221) с применением полученных в лаборатории структур Fab в качестве моделей для поиска. Построение структуры BTC осуществляли непосредственно в частично уточненной модели Fab с применением COOT (v. 0.8.8) (Emsley & Cowtan (2004) Acta Cryst. D60:2126-2132). Многократное построение и

уточнение конечной модели осуществляли с применением COOT и PHENIX. Количество копий модели BTC/Fab в асимметричной единице элементарной ячейки, значения R_{work} и R_{free} , значения среднеквадратичного (r.m.s) отклонения длин связей и углов связей кратко описаны в таблице 11.

[617] Структурный эпитоп определяли как остатки BTC, которые содержат атомы в пределах 5 Å от любого атома в Fab. Такие остатки идентифицировали с помощью программы ACT в программном пакете CCP4 (v. 7.0.045 Winn et al., (2011) Acta. Cryst. D67:235-242). Если в асимметричной единице существует множество копий комплекса, то только те остатки, контактирующие с антителом, которые являются общими во всех копиях, считаются остатками структурного эпитопа. Остатки эпитопа и соответствующие контактные остатки Fab, идентифицированные в структурах комплексов Fab NVS1, NVS2, NVS3 и NVS4, перечислены в таблицах 12, 13, 14 и 15 соответственно (цепи H для тяжелой цепи и L для легких цепей).

Таблица 11. Краткое описание данных по дифракции и уточнению структуры

Параметры	BTC/NVS2	BTC/NVS3	BTC/NVS1	BTC/NVS4
Разрешение	2,7 Å	1,7 Å	2,8 Å	3,0 Å
Пространственная группа	P2 ₁	P4 ₂ 2 ₁ 2	P3 ₂	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Элементарная ячейка (a, b, c, альфа, бета, гамма)	44,8 Å 201,3 Å 67,1 Å 90,0° 92,4° 90,0°	123,8 Å 123,8 Å 125,1 Å 90,0° 90,0° 90,0°	176,5 Å 176,5 Å 186,6 Å 90,0° 90,0° 120,0°	70,5 Å 158,7 Å 200,4 Å 90,0° 90,0° 90,0°
Количество комплексов/a.s.u.	2	1	12	4
R_{work} , R_{free}	23,4%, 30,5%	15,6%, 17,2%	19,0%, 27,4%	19,8%, 28,3%
r.m.s. отклонение длин связей, углов связей	0,011 Å, 1,374°	0,009 Å, 0,990°	0,009 Å, 1,184°	0,010 Å, 1,22°

Структура эпитопа BTC

[618] Структура BTC представляет собой EGF-складку с пятью бета-нитями в трехнитевом и двухнитевом слое. Структура стабилизируется тремя дисульфидными связями. Наблюдаемая структура BTC является высококонсервативной во всех кристаллических структурах. Структура сходна с ранее опубликованной ЯМР-структурой (pdb: 1PO, Miura, K. et. al. (2002) Biochem.Biophys. Res. Comm 294 1040-1046) за исключением значительного сдвига двух C-концевых бета-нитей. Как проиллюстрировано на фигурах 1 и 2, оба эпитопа и общая ориентация Fab варьируются между комплексами.

[619] Кристаллические структуры Fab NVS2, связанного с BTC человека,

применяли для идентификации структурного эпитопа на ВТС. Поверхность взаимодействия образована несколькими непрерывными и прерывистыми (т. е. несмежными) последовательностями, а именно остатками (40-43, 45-46, 58-61, 72-73, 75-76), как подробно показано в таблице 12. Эти остатки образуют трехмерный конформационный эпитоп, который распознается Fab NVS2 (фиг. 1А и 2А).

[620] Кристаллические структуры Fab NVS3, связанного с ВТС человека, применяли для идентификации структурного эпитопа на ВТС. Поверхность взаимодействия образована несколькими непрерывными и прерывистыми (т. е. несмежными) последовательностями, а именно остатками (34-42, 51, 53-54, 56), как подробно показано в таблице 13. Эти остатки образуют трехмерный конформационный эпитоп, который распознается Fab NVS3 (фиг. 1В и 2В).

[621] Кристаллические структуры Fab NVS1, связанного с ВТС человека, применяли для идентификации структурного эпитопа на ВТС. Поверхность взаимодействия образована несколькими непрерывными и прерывистыми (т. е. несмежными) последовательностями, а именно остатками (38-43, 45-46, 54, 59-71, 73), как подробно показано в таблице 14. Эти остатки образуют трехмерный конформационный эпитоп, который распознается Fab NVS1 (фиг. 1С и 2С).

[622] Кристаллические структуры Fab NVS4, связанного с ВТС человека, применяли для идентификации структурного эпитопа на ВТС. Поверхность взаимодействия образована несколькими непрерывными и прерывистыми (т. е. несмежными) последовательностями, а именно остатками (37-43, 45-46, 54, 57, 59-61, 72-73, 75), как подробно показано в таблице 15. Эти остатки образуют трехмерный конформационный эпитоп, который распознается Fab NVS4 (фиг. 1D и 2D).

[623] Взаимодействия между ВТС человека и Fab NVS2. Остатки ВТС пронумерованы на основании SEQ ID NO: 157. Остатки Fab пронумерованы на основании их линейной аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 36 и 47). Показанные остатки ВТС содержат по меньшей мере один атом в пределах 5 Å от атома в Fab NVS2 для учета потенциальных взаимодействий, опосредованных водой. Взаимодействия являются общими между двумя копиями комплекса в асимметричной единице.

Таблица 12. Взаимодействия между ВТС человека и Fab NVS2

ВТС		Fab NVS2		
Аминокислота	Номер	Аминокислота	Номер	Цепь
PRO	40	TYR	32	L
LYS	41	GLY	29	L
		ASP	30	L
GLN	42	GLY	29	L
		ASP	30	L
		LYS	31	L

		TYR	32	L
		ASP	51	L
		TYR	93	L
TYR	43	TYR	101	H
		GLU	105	H
		TYR	32	L
		TYR	34	L
		GLN	50	L
		TYR	93	L
HIS	45	TYR	93	L
		LEU	94	L
TYR	46	TYR	101	H
		TYR	102	H
		PHE	103	H
		TYR	93	L
GLU	58	ARG	100	H
GLN	59	ARG	100	H
		GLN	50	L
		LYS	53	L
THR	60	ARG	100	H
		TYR	101	H
PRO	61	TYR	101	H
ALA	72	TYR	102	H
ARG	73	TYR	102	H
		PHE	103	H
		TYR	93	L
		LEU	94	L
		SER	96	L
GLU	75	TYR	102	H
ARG	76	SER	57	H

[624] Взаимодействия между BTC человека и Fab NVS3. Остатки BTC пронумерованы на основании SEQ ID NO: 157. Остатки Fab пронумерованы на основании их линейной аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 56 и 67). Показанные остатки BTC содержат по меньшей мере один атом в пределах 5 Å от атома в Fab NVS3 для учета потенциальных взаимодействий, опосредованных водой.

Таблица 13. Взаимодействия между ВТС человека и Fab NVS3

ВТС		Fab NVS3		
Аминокислота	Номер	Аминокислота	Номер	Цепь
GLY	34	HIS	53	L
		VAL	54	L
HIS	35	HIS	53	L
		VAL	54	L
		GLY	55	L
		TYR	56	L
PHE	36	HIS	53	L
		TYR	56	L
		ASP	101	L
		PHE	102	L
SER	37	GLN	93	H
		TYR	56	L
		ASP	101	L
		PHE	102	L
ARG	38	TYR	31	H
		ASP	49	H
		ASP	101	L
		PHE	102	L
		GLY	103	L
		TYR	104	L
		TYR	105	L
CYS	39	TYR	31	H
PRO	40	TYR	31	H
LYS	41	ILE	27	H
		GLY	28	H
		LYS	29	H
		LYS	30	H
		TYR	31	H
		ASP	50	H
		ASN	65	H
GLN	42	LYS	29	H

ARG	51	TYR	99	L
		LEU	100	L
		ASP	101	L
		TYR	104	L
ARG	53	HIS	53	L
		ASP	101	L
PHE	54	GLN	93	H
VAL	56	GLN	93	H
		TYR	56	L

[625] Взаимодействия между BTC человека и Fab NVS1. Остатки BTC пронумерованы на основании SEQ ID NO: 157. Остатки Fab пронумерованы на основании их линейной аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 12 и 23). Показанные остатки BTC содержат по меньшей мере один атом в пределах 5 Å от атома в Fab NVS1 для учета потенциальных взаимодействий, опосредованных водой. Взаимодействия являются общими между 12 копиями комплекса в асимметричной единице.

Таблица 14. Взаимодействия между BTC человека и Fab NVS1.

BTC		Fab NVS1		
Аминокислота	Номер	Аминокислота	Номер	Цепь
ARG	38	SER	28	L
		ILE	29	L
		SER	30	L
		PHE	32	L
		ASP	92	L
CYS	39	PHE	32	L
		ASP	92	L
PRO	40	PHE	32	L
		TYR	91	L
		ASP	92	L
LYS	41	SER	28	L
		ASP	92	L
		ASP	93	L
GLN	42	VAL	52	H
		TRP	54	H
		GLY	104	H
		ILE	105	H

		HIS	106	H
		TYR	91	L
		ASP	92	L
		PHE	94	L
		MET	96	L
TYR	43	TRP	54	H
		SER	101	H
		TYR	103	H
		GLY	104	H
		ILE	105	H
		HIS	106	H
HIS	45	TRP	54	H
TYR	46	TRP	54	H
		TYR	103	H
PHE	54	HIS	106	H
		PHE	32	L
GLN	59	SER	101	H
		HIS	106	H
		ALA	50	L
		TYR	91	L
THR	60	TYR	103	H
PRO	61	TYR	103	H
ARG	73	TRP	54	H

[626] Взаимодействия между BTC человека и Fab NVS4. Остатки BTC пронумерованы на основании SEQ ID NO: 157. Остатки Fab пронумерованы на основании их линейной аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 80 и 90). Показанные остатки BTC содержат по меньшей мере один атом в пределах 5 Å от атома в Fab NVS4 для учета потенциальных взаимодействий, опосредованных водой. Взаимодействия являются общими между 4 копиями комплекса в асимметричной единице.

Таблица 15. Взаимодействия между BTC человека и Fab NVS4.

BTC		Fab NVS4		
Аминокислота	Номер	Аминокислота	Номер	Цепь
SER	37	TYR	32	L
ARG	38	TYR	32	L
CYS	39	TYR	32	L

BTC		Fab NVS4		
Аминокислота	Номер	Аминокислота	Номер	Цепь
PRO	40	TYR	32	L
		ASP	92	L
LYS	41	ILE	2	L
		GLN	27	L
		GLY	28	L
		ASP	92	L
		ALA	93	L
GLN	42	TYR	50	H
		PHE	57	H
		ASN	59	H
		SER	101	H
		TYR	91	L
		ASP	92	L
		ALA	93	L
		LEU	94	L
		ASN	95	L
TYR	43	TRP	33	H
		TYR	50	H
		PHE	57	H
		GLY	100	H
		SER	101	H
		TYR	91	L
HIS	45	PHE	57	H
TYR	46	TRP	33	H
		ASP	52	H
		SER	53	H
		THR	54	H
		PHE	57	H
PHE	54	SER	101	H
		TYR	32	L
		TYR	91	L
ALA	57	TYR	49	L

BTC		Fab NVS4		
Аминокислота	Номер	Аминокислота	Номер	Цепь
GLN	59	SER	101	H
		LEU	102	H
		TYR	32	L
		ALA	50	L
		TYR	91	L
THR	60	TRP	33	H
PRO	61	TRP	33	H
ALA	72	THR	54	H
ARG	73	ASP	52	H
		THR	54	H
		PHE	57	H
GLU	75	THR	54	H

Пример 3. Получение биспецифического Fab к BTC/VEGF

[627] Часть Fab к VEGF биспецифической молекулы получали из scFv к VEGF (scFv 1008), ранее раскрытого в US 20120014958 и идентифицированного как 578minimaxT84N_V89L или белок № 1008, который включен посредством ссылки во всей своей полноте. Для преобразования scFv 1008 в его Fab-версию аминокислотную последовательность scFv 1008 выравняли с опубликованными каркасными последовательностями IgG человека и определяли, что они характеризуются высокой гомологией с каркасом каппа.

[628] Следовательно, scFv 1008 преобразовывали посредством добавления 1) последовательности константной области каппа-цепи иммуноглобулина человека (SEQ ID NO: 159) к С-концу VL scFv 1008 и 2) первого константного Ig-домена иммуноглобулина человека из последовательности тяжелой цепи (домен CH1) (SEQ ID NO: 160) к С-концу VH scFv 1008.

[629] Для биспецифических молекул получали две ориентации (фигура 3). В ориентации 1 Fab к BTC находился на N-конце, в то время как Fab к VEGF находился на С-конце молекулы. В ориентации 2 Fab к VEGF находился на N-конце, в то время как Fab к BTC находился на С-конце молекулы. Тяжелые цепи двух Fab соединяли посредством линкера (GSGGG)₃ (SEQ ID NO: 118) и две легкие цепи соединяли посредством линкера (GSGGG)₃ (SEQ ID NO: 118).

[630] Нуклеотиды, кодирующие аминокислоты легкой и тяжелой цепей антитела к BTC и антитела к VEGF, синтезировали с помощью Genewiz, LLC и доставляли в вектор pUC57. Для клонирования в вектор экспрессии 4 мкг плазмидной ДНК расщепляли в течение ночи с помощью рестрикционных ферментов HindIII и XbaI при 37°C. Проводили

электрофорез расщепленных плазмид в 1% агарозном геле в течение 40 минут при напряжении 100 вольт. Полосу, соответствующую размеру представляющего интерес фрагмента расщепленной ДНК, выделяли из геля и ДНК извлекали с применением набора для выделения из геля QIAquick (Qiagen, № по кат. 28704) в соответствии протоколом производителя. Фрагмент антитела к BTC/VEGF, расщепленный с помощью HindIII/XbaI, клонировали в вектор экспрессии pRS5a, расщепленный с помощью HindIII/XbaI, в соответствии с протоколом производителя с применением системы LIGAFast™ для быстрого лигирования ДНК (Promega, № по кат. M8225). Продуктом лигирования трансформировали химически компетентные клетки E. coli OneShot TOP10 (Invitrogen, № по кат. C4040-10), высевали на чашку с LB-агаром, содержащим 100 мкг/мл карбенициллина, и инкубировали при 37°C в течение ночи. Собирали четыре колонии, выращивали в течение ночи в среде LB, содержащей 100 мкг/мл карбенициллина, при 37°C. С помощью набора QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, № по кат. No. 27104) ДНК выделяли из этих бактериальных культур по протоколу производителя. Выделенную ДНК отправляли на секвенирование для скрининга и отбора продукта, лигированного надлежащим образом. После подтверждения корректных клонов с помощью ДНК снова трансформировали химически компетентные клетки E. coli OneShot TOP10 и одну колонию отбирали и выращивали для масштабирования количества ДНК с применением набора HiPure Plasmid Megaprep (Invitrogen, № по кат. K57010) в соответствии с протоколом производителя с получением достаточного количества ДНК для временной экспрессии белка HEK293.

[631] Высевали $0,5 \times 10^6$ клеток HEK293FreeStyle/мл за день до трансфекции в 1 л среды для экспрессии FreeStyle 293 (Invitrogen, № по кат. 12338018) в колбе Эрленмейера объемом 3 л (Corning, № по кат. 431252) таким образом, что клетки достигали плотности, составляющей примерно 1×10^6 клеток/мл, и > 95% жизнеспособности в день трансфекции. Для трансфекции культуры объемом 1 л в одну пробирку добавляли 2 мл раствора полиэтиленимина (PEI) с концентрацией 1 мг/мл в 23 мл среды для экспрессии FreeStyle 293, и в другую пробирку, содержащую 25 мл среды для экспрессии FreeStyle 293, добавляли 0,5 мг ДНК-вектора экспрессии, кодирующего легкую цепь, и 0,5 мг ДНК-вектора экспрессии, кодирующего тяжелую цепь. Обе пробирки инкубировали в течение 5-10 минут. Плазмидную ДНК, содержащуюся в пробирке, фильтровали через мембрану Steriflip (Millipore, № по кат. SCGP00525) с диаметром пор 0,22 мкм для предотвращения потенциального контаминирования. Эту смесь ДНК затем добавляли в другую пробирку, содержащую PEI, и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 минут. После инкубации смесь для трансфекции добавляли в культуру клеток, содержащую 1×10^6 клеток/мл, и культивировали в течение 5 дней при 37°C, встряхивании при 125 об./мин и с 5-10% CO₂. Культуру собирали, центрифугировали и надосадочную жидкость фильтровали через мембрану Stericup (Millipore, № по кат. SCGU11RE) с диаметром пор 0,22 мкм перед очисткой с применением стандартных аффинных смол, например, системы АТКА от GE Healthcare Life Science's.

[632] Собранную культуру, содержащую биспецифический Fab к BTC/VEGF, очищали посредством пропускания через аффинную заполненную колонку CaptureSelect IgG-CN1 объемом 5 мл (Life Technologies, № по кат. 494320005) с применением системы АТКА от GE. После завершения загрузки 20-50 объемов колонки (CV) промывочного буфера на основе PBS с pH 7,4 пропускали через смолу для удаления любых неспецифически связывающихся компонентов с последующим пропусканием 16-20 CV 100 mM цитратного буфера с pH 3,0 с градиентом элюирования и низким pH (Teknova, № по кат. Q2445). Элюированную фракцию, содержащую биспецифический Fab, подвергали дополнительной очистке для повышения чистоты с применением полимодальной смолы для хроматографии и заполненной колонки HiTrap CaptoAdhere объемом 5 мл (GE Healthcare Life Sciences, № по кат. 28405846). Колонка CaptoAdhere представляет собой сильный анионообменник с полимодальной функциональностью, который способен удалять агрегаты, белки клеток-хозяев, нуклеиновые кислоты и вирусы. pH ранее элюированного раствора белка повышали до значения выше его изоэлектрической точки (pI) с помощью 1 М Трис-HCl с pH 9,5 (Teknova, № по кат. T1095) с получением суммарного отрицательного заряда для связывания белка со смолой. После загрузки в колонку ее промывали с помощью PBS с pH 7,4, и элюировали с помощью градиента 100 mM цитратного буфера с pH 3,0. Элюированные фракции анализировали в геле для SDS-PAGE для отбора фракций с высокой чистотой. Объединенные фракции концентрировали, а буфер заменяли на PBS с pH 7,4 с применением концентрата белков Vivaspın20 с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа (Sartorius, № по кат. VS2001). Наконец, осуществляли дополнительное определение характеристик белка для определения концентрации с применением УФ-поглощения при 280 нм, для определения чистоты с применением геля для SDS-PAGE, для определения агрегации и чистоты посредством SEC-HPLC, для подтверждения корректной молекулярной массы посредством LC/MS и для определения уровня эндотоксина с помощью картриджа Charles River LAL с применением системы Endosafe.

Пример 4. Длительная экспрессия BTC у мышей вызывает дилатацию сосудов и утечку жидкости через сосуды, что приводит к отеку сетчатки

[633] Животная модель и план исследования. Исследования *in vivo* проводили на самках мышей C57/B16J (возрастом 8-10 недель), приобретенных в Jackson Laboratories (Бар Харбор, Мэн). Влияние сверхэкспрессии BTC на сетчатку мышей исследовали посредством инъекции (субретинальной, s.r.) самокомплементарных аденоассоциированных вирусов серотипа 2 (scAAV2), которые экспрессировали BTC под контролем промотора цитомегаловируса (CMV). В оба глаза одного животного путем инъекции вводили одинаковую дозу scAAV2-CMV-BTC и тестировали две разные дозы. Контрольные глаза (без обработки, обработанные буфером для составления или путем инъекции нулевого scAAV2) и тестируемые глаза визуализировали (цветная съемка глазного дна, флуоресцентная ангиография глазного дна (FFA), сканирующая лазерная офтальмоскопия (SLO) и оптическая когерентная томография (OCT)) через 4-6 недель

после доставки. Детали каждого из проведенных исследований описаны в таблице 16 ниже.

Таблица 16. Краткое описание субретинальной обработки мышей с помощью ВТС

Исследование № 1			
Субретинальная обработка	Объем/доза (в. г./глаз)	Глаза, зарегистрированные для OCT	Глаза, зарегистрированные для SLO
Без обработки	N/A	10	N/A
scAAV2-CMV-BTC	1 мкл/1×10 ⁸	8	N/A
Буфер для составления	1 мкл	8	N/A
scAAV2-нулевой	1 мкл/1×10 ⁸	8	N/A
Исследование № 2			
Субретинальная обработка	Объем/доза (в. г./глаз)	Глаза, зарегистрированные для 1-ой OCT/2-ой OCT	Глаза, зарегистрированные для SLO
scAAV2-CMV-BTC	1 мкл/5×10 ⁸	10/20	10
scAAV2-нулевой	1 мкл/5×10 ⁸	10/8*	10
*Одна мышь погибла до визуализации			

[634] Подготовка животных к субретинальным инъекциям или визуализации. Мышинные глаза расширяли с помощью циклопентолата (1%, местное введение) и фенилэфрина (2,5% или 10% в зависимости от доступности, местное введение). Роговицу десенсибилизировали пропаракаином (0,5%, местное введение). Мыши также получали интраперитонеальную (i.p.) инъекцию смеси кетамин/ксилазин (100-150 мг/кг и 5-10 мг/кг соответственно) для седации.

[635] Субретинальная доставка scAAV2-CMV-BTC. Анестезированных животных позиционировали под хирургическим микроскопом. Иглу с тупым концом, прикрепленную к шприцу Гамильтона объемом 10 мкл, вводили через небольшой склеральный разрез. Иглу направляли сзади от хрусталика, по направлению к височной части сетчатки, пока не почувствовалось сопротивление. 1 мкл scAAV2-CMV-BTC (содержащий 200 мкг/мл флуоресцеина натрия) медленно путем инъекции вводили в субретинальное пространство. Тестировали две дозы: 1 × 10⁸ вирусных геномов (в. г./глаз) или 5 × 10⁸ в. г./глаз. Успешные инъекции подтверждали посредством визуализации пузырька, содержащего флуоресцеин, через предварительно расширенный зрачок. Глаза со значительным кровоизлиянием или утечкой раствора вектора из субретинального пространства в стекловидное тело исключали из дальнейшего исследования. После

процедуры на глаза наносили офтальмологическую мазь на основе 0,3% тобрамицина и мыши обеспечивали восстановление после анестезии до возвращения в свою клетку в виварии. Здоровье животных отслеживали, как описано в процитированных протоколах.

[636] Съемка глазного дна и флуоресцентная ангиография глазного дна (FFA). Анестезированных мышей помещали на нагретый столик. Глаз, подвергаемый визуализации (обычно правый глаз, OD), поддерживали влажным с помощью смазывающего средства для глаз (Gentel или эквивалент), и сетчатку фотографировали с помощью системы Micron III (Phoenix Research Laboratories, Плезантон, Калифорния), FFFA проводили только в исследовании 1. Процедура такая же, как и при съемке глазного дна, с той лишь разницей, что флуоресцеин (100 мг/кг) вводили путем инъекции (i.p.) перед анестезией. Мышей визуализировали через 2-3 минуты после инъекции флуоресцентного красителя. Для каждого глаза, подвергаемого визуализации, получали 1-3 фотографии.

[637] Визуализация посредством сканирующей лазерной офтальмоскопии (SLO). Мышей анестезировали и их зрачки расширяли, как описано. Влажность поддерживали с помощью капель смазывающего средства на основе гипромеллозы. 15 мг/кг индоцианина зеленого (ICG) с концентрацией 2,9 мг/мл и 50 мг/кг раствора флуоресцеина натрия с концентрацией 20 мг/мл путем i.p. инъекции вводили мыши, чтобы пометить сосуды и оценить утечку из сетчатки. Через три минуты после этого путем инъекции вводили красители; мышей последовательно анестезировали путем интраперитонеальной инъекции смеси кетамин/ксилазин (100-150/5-10 мг/кг). Также в качестве местного анестетика для роговицы использовали пропаракаин (0,5%).

[638] ВТС-индуцированные изменения проницаемости сосудов сетчатки оценивали с применением флуоресцеина и каналов ICG системы для флуоресцентной ангиографии на основе SLO. ICG связывает белки плазмы крови, образуя высокомолекулярную структуру, которая сохраняется в сосудах, и следовательно, позволяет захватывать карту архитектуры сосудов. Проницаемость сосудов сетчатки последовательно оценивали посредством инъекции низкомолекулярного красителя флуоресцеина натрия, который известен утечкой из сосудов сетчатки после инъекции ВТС.

[639] Экспортированные изображения представляли собой среднее из до 40 зарегистрированных SLO-изображений, полученных с помощью 55-градусной линзы, центрированной на зрительный нерв.

[640] Оптическая когерентная томография (OCT) В первую временную точку в исследовании 2 OCT-изображения получали в сочетании со SLO-изображениями, что делало подготовку к визуализации одинаковой. Визуализацию посредством SLO для исследования 1 не осуществляли, следовательно, подготовка животных была такой же, как описано на всем протяжении данного документа. Изображения OCT получали с применением системы для спектральной OCT (Envisu R2200, Bioptigen, Моррисвилл, Северная Каролина). Волнометрические сканы центрировали на зрительном нерве, и они состояли из 400×400 а-сканов, распределенных среди поля зрения площадью 1,7×1,7 мм.

Горизонтальные и вертикальные линейные b-сканы шириной 1,8 мм. Также получали b-сканы, пересекающие зрительный нерв. Они состояли в среднем из примерно 10 b-сканов в каждом участке, которые выравнивали и обрабатывали с применением скрипта в MATLAB® (Mathworks, Нейтик, Массачусетс, США).

[641] Количественное определение толщины сетчатки с помощью изображений OCT. Количественное определение толщины сетчатки проводили только в исследовании 1. Морфометрический анализ проводили с применением извлеченных изображений (за исключением зрительного нерва) в MATLAB® посредством ручного очерчивания слоя нервных волокон и мембраны Бруха для расчета общей толщины сетчатки. Количественное определение состояло из значений, полученных с помощью скана, а также измерения самых толстых 10% сетчатки с целью захвата фокальных изменений, которые могли быть скрыты из-за данных из большей области сетчатки.

[642] Статистический анализ. GraphPad Prism (Ла Хойя, Калифорния, США) применяли для нанесения на график морфометрических данных и выполнения статистических анализов. При сравнении изменений толщины применяли однофакторный ANOVA с пост-тестом Тьюки для сравнения между группами, каждую из которых обрабатывали как независимую точку данных. Планки погрешностей приведены как стандартная ошибка со значимостью $P < 0,05$ если не указано иное.

[643] Результаты - съемка глазного дна и FFA. Исследование № 1. Мышам путем инъекции (s.r.) вводили scAAV2-CMV-BTC и визуализацию осуществляли через четыре недели. Съемка глазного дна (фиг. 4, левая панель) демонстрировала извилистость сосудов сетчатки, утечку жидкости через сосуды и возможные отслоения сетчатки. Также наблюдали потенциальные кровоизлияния сетчатки. При визуализации посредством FFA (фиг. 4, правая панель) извилистость сетчатки и утечка жидкости через сосуды были очевидными.

[644] Результаты - сканирующая лазерная офтальмоскопия (SLO). SLO-изображения получали только в исследовании № 2. Изображения, полученные у контрольных мышей, которым путем инъекции вводили нулевой AAV2, были нормальными и не демонстрировали утечку жидкости через сосуды. Сетчатки, в которые путем инъекции вводили scAAV2-CMV-BTC, демонстрировали повышенные извилистость сосудов и утечку жидкости через сосуды. В некоторых глазах отслоение сетчатки, выявленное посредством OCT, не позволяло получить высококачественные SLO-изображения сосудов сетчатки. Иллюстративные SLO-изображения показаны на фиг. 5A на примере мышей, которым путем инъекции (s.r.) вводили контрольный вектор (scAAV2-нулевой, 5×10^8 в. г./глаз). Наблюдаются четко очерченные сосуды без утечки жидкости через сосуды. Напротив, у мышей, которым путем инъекции (s.r.) вводили scAAV2-CMV-BTC, присутствовали извилистые сосуды и утечка флуоресцеина (фиг. 5B).

Пример 5. FACS-анализ связывания для оценки связывания антител с BTC, связанным с мембраной

[645] Сначала клетки 293F, которые не экспрессировали BTC на поверхности, и

устойчивые клетки 293F-hBTC, которые экспрессировали BTC на клеточной поверхности, высевали до образования конфлюэнтного монослоя. После промывания клеток клетки диссоциировали с применением версена при 37°C. Клетки промывали буфером для FACS и высевали в объеме 100 мкл в 96-луночный планшет с применением клеток при 1×10^6 клеток/мл. Затем применяли 100 мкл последовательного разбавления антител, начиная с 50 нМ. Клетки инкубировали, промывали и затем обрабатывали вторичным антителом к Fab-FITC человека. Антитела связывались только с клетками, экспрессирующими BTC. После этого клетки промывали и анализировали на приборе Attune для проточной цитометрии. Анализ всех данных проводили с применением программного обеспечения Flow Jo.

[646] На фиг. 6A-6D показано, что как биспецифические Fab-Fab (NVS11, NVS12 и NVS13), так и их соответствующие Fab к BTC (NVS1, NVS2 и NVS3) демонстрировали сопоставимое связывание с BTC, связанным с мембраной. На фиг. 6A проточную цитометрию применяли для оценки связывания NVS11 с BTC, связанным с мембраной, с применением антитела к Fab человека для выявления. NVS11 связывается с BTC, связанным с мембраной, сверхэкспрессирующимся на клетках 293F со средним значением EC50, составляющим 93 ± 42 пМ ($9,0 \pm 4,0$ нг/мл)

[647] Твердофазный иммуноферментный сэндвич-анализ (ELISA) проводили посредством нанесения BTC или VEGF в виде покрытия, затем добавляли титрование NVS11 с последующим выявлением со второй мишенью, биотинилированным BTC или биотинилированным VEGF. Как показано на фиг. 6E и 6F, в обоих форматах NVS11 способен связываться с BTC и VEGF одновременно. Ни один из отдельных Fab, NVS1 или NVS8, не был способен связываться одновременно с BTC и VEGF.

[648] Нейтрализацию VEGF с помощью NVS11 определяли посредством ELISA. Различные концентрации NVS11 предварительно инкубировали с биотинилированным VEGF человека и добавляли в планшеты, покрытые VEGFR2-Fc. Как показано на фиг. 6G, VEGF-биотин, связанный с VEGFR2, выявляли с помощью конъюгата стрептавидин-HRP. NVS11 подавляло связывание VEGF человека с VEGFR2-Fc человека со средним значением IC50, составляющим 1300 ± 200 пМ (127 ± 19 нг/мл).

Пример 6. Определение K_D посредством Biacore

[649] Сначала поверхностный плазмонный резонанс применяли для измерений аффинности связывания BTC или VEGF с NVS11, захваченным на чипе. NVS11 связывается с BTC человека и яванского макака с K_D , составляющими 5,8 и 7,2 пМ соответственно, и с VEGF-A человека с 18,6 пМ. Последовательности изоформ VEGF-A198, -165, -121 и -111 человека и яванского макака идентичны на 100%. Следовательно, аффинность к VEGF-A яванского макака идентична аффинности к VEGF-A человека. Константы скорости ассоциации и диссоциации и значения аффинности перечислены в таблице 17 ниже.

Таблица 17. Средние кинетические константы скорости и значения аффинности NVS11 к BTC человека и яванского макака и VEGF-A человека

Антитело	Разновидности лигандов	Среднее	k_{ass}	Среднее	k_{diss}	Среднее	KD
		значение (1/мс)		значение (1/с)		значение (M)	
NVS11	ВТС человека	5,1E+06		3,0E-05		5,8E-12	
NVS11	ВТС яванского макака	4,2E+06		3,0E-05		7,2E-12	
NVS11	VEGF ₁₆₅ человека (На 100% идентичен VEGF ₁₆₅ яванского макака)	1,3E+06		2,4E-05		1,86E-11	

[650] Средние значения для VEGF человека рассчитывают на основании данных из 5 отдельных экспериментов. Средние значения для ВТС человека и яванского макака рассчитывают на основании данных из 7 отдельных экспериментов.

[651] Чтобы оценить, влияет ли на связывание с ВТС или VEGF присутствие Fab в биспецифической форме, проводили процедуры определения аффинности с применением Biacore. Кинетические константы скорости определяли посредством SPR с применением прибора Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare), как описано ниже. Способ захвата антител к Fab использовали с целью определения кинетики Fab и биспецифических конструкций к ВТС. Осуществляли иммобилизацию коммерчески доступного IgG к Fab для захвата (Jackson Immuno research) на поверхности чипа с применением протокола сочетания с аминами, предусмотренного GE. Это иммобилизованное антитело захватывало отдельные Fab и биспецифические конструкции. Цель состояла в захвате количеств Fab для достижения значения R_{max} , составляющего 20. Затем ВТС пропускали через Fab в качестве анализа. Начинали с концентрации ВТС, составляющей 5 нМ, и затем последовательно разбавляли при 1:2 с получением семи концентраций. Регенерацию проводили в конце каждого цикла концентраций с применением конечного 1% раствора фосфорной кислоты с 1:10 5 мМ NaOH, пропускаемого при 60 мкл/мин в течение 1 минуты.

[652] Вычитание двух эталонных значений завершали с получением конечных данных. Необработанные данные аппроксимировали к модели связывания 1:1 с параметром(параметрами) R_{max} , установленным(установленными) на локальном уровне.

[653] В таблице 18 ниже показано, что аффинность является сопоставимой для ВТС и VEGF между Fab и их соответствующими биспецифическими конструкциями.

Таблица 18. Аффинность моно- и биспецифических антител

Конструкция	ВТС человека			VEGF человека		
	Ka	Kd	KD (нМ)	Ka	Kd	KD (нМ)
NVS1	1,98E+07	3,39E-05	1,7	Связывание не выявлено		
NVS11	2,47E+07	4,41E-05	1,8	1,54E+06	3,81E-05	2,5
NVS2	1,12E+07	5,26E-05	4,7	Связывание не выявлено		

NVS12	1,11E+07	6,67E-05	6,0	1,46E+06	2,46E-05	17,0
NVS4	1,14E+07	4,86E-05	4,3	(неспецифическое связывание)		
NVS14	1,67E+07	3,22E-05	2,0	1,48E+06	2,40E-05	16,0
NVS3	1,35E+07	5,98E-05	4,4	Связывание не выявлено		
NVS13	1,33E+07	2,40E-05	1,8	1,55E+06	1,01E-05	6,5
NVS8	Связывание не выявлено			5,26E+06	1,52E-05	3,0

Пример 7. Эффективность нейтрализации антител для блокирования связывания ВТС с ErbB1 или ErbB4

[654] С целью оценки эффективности Fab и биспецифической конструкции для нейтрализующего связывания ВТС с его рецептором Erb1 или ErbB4, проводили следующий анализ. Клетки НКВ11, сверхэкспрессирующие ErbB1 или ErbB4, высевали при 1×10^5 клеток/лунка. Клетки один раз промывали буфером для FACS посредством центрифугирования при 1200 об./мин в течение 5 минут и удаляли надосадочную жидкость. Затем получали разбавления образцов Fab и ВТС в буфере для FACS. ВТС человека-авидиновая метка-биотин разбавляли до фиксированной концентрации 15 нМ. Тестируемые образцы Fab получали при начальной концентрации 40 нМ и титровали при 9 точках титрования при последовательном разбавлении 1:2. Как биотин-ВТС, так и тестируемые образцы Fab инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Предварительно инкубированные образцы затем добавляли к планшету для клеток при 100 мкл на лунку в двух повторностях и инкубировали в течение 1 часа на льду. Планшет затем один раз промывали в буфере для FACS, центрифугировали при 1200 об./мин в течение 5 минут и удаляли надосадочную жидкость. После суспендирования осадка клеток со 100 мкл/лунка в разбавленном конъюгате вторичное антитело-стрептавидин-Alexa Fluor488 (1:2000) в буфере для FACS клетки затем инкубировали в течение 60 мин на льду. Клетки один раз промывали буфером для FACS и ресуспендировали в 120 мкл буфера для FACS для анализа посредством проточной цитометрии.

[655] Измерения проводили на аппарате Attune для проточной цитометрии. Данные анализировали с применением программного обеспечения Flow Jo. Анализируемые популяции живых клеток гейтировали по прямому и боковому рассеянию (точечный график FSC-A/SSC-A). Интервальный гейт устанавливали на контрольной гистограмме, которую получали с образцом, инкубированном только в конъюгате стрептавидин-Alexa Fluor488, и затем определяли процент положительных событий связывания клеток, несущих рецептор ErbB1 или ErbB4, связанный с мембраной, и конъюгат биотин-ВТС. Медианное значение интенсивности флуоресценции (MFI) также получали для популяции живых клеток. Значения MFI затем применяли для расчета процента подавления тестируемого образца и затем наносили на график в GraphPad Prism 7.03 с применением модели нелинейной регрессии (аппроксимация кривой) для получения значения IC50.

[656] На фиг. 7 показано ингибирование связывания 2 нМ ВТС с ErbB1, и на фиг. 8 показано ингибирование связывания 2 нМ ВТС с ErbB4. На фиг. 7 и 8 показано, что оба

биспецифических Fab-Fab и их соответствующие Fab к ВТС демонстрировали сопоставимую эффективность ингибирования связывания ВТС с ErbB1 или ErbB4.

[657] Клеточный анализ эффективности посредством проточной цитометрии проводили с применением клеток НКВ11, сверхэкспрессирующих ErbB1 или ErbB4 на клеточной поверхности. NVS11 предварительно инкубировали при варьирующихся концентрациях с 15 нМ растворимого конъюгата ВТС человека-авидиновая метка-биотин, чтобы оценить связывание NVS11 с ВТС. Как показано на фиг. 8E и 8F, NVS11 блокировало связывание растворимого ВТС с ErbB1 и ErbB4 человека со средним значением IC₅₀, составляющим 2,9±0,3 нМ (279±29 нг/мл) для ErbB1 и 4,6±2,7 нМ (443±260 нг/мл) для ErbB4.

[658] Как показано на фиг. 8G, формат ELISA с применением специфических антител для выявления фосфорилированного EGFR позволил подтвердить, что предварительная инкубация растворимого ВТС с NVS1 или NVS11 предотвращала ВТС-индуцируемое фосфорилирование EGFR, эндогенно экспрессируемого в линии клеток NCI/ADR-RES карциномы яичника человека.

Пример 8. Эффективность нейтрализации антител для блокирования связывания VEGF-A с VEGFR2

[659] VEGF-A регулирует ангиогенез и проницаемость сосудов посредством связывания и активации с помощью VEGFR2. Сверхэкспрессия VEGF-A связана с повышенной проницаемостью микрососудов и ангиогенезом при глазных состояниях, таких как DR и AMD. Цель следующего эксперимента состояла в тестировании эффективности антител для нейтрализующего связывания VEGF-A с VEGFR2.

[660] VEGF-R2 (R&D systems, № 357-KD/CF) наносили в виде покрытия при 4 мкг/мл в 1XPBS при 20 мкл/лунка в течение ночи при 4°C в 384-луночных планшетах MaxiSorp. Затем планшеты 3 раза промывали с применением 1XTBST. Планшеты блокировали в разбавителе (0,1% Tween 20/0,1% TritonX100) с 2% BSA в течение ночи. После блокирования планшеты 3 раза промывали с применением TBST и затем добавляли смесь образцов при 20 мкл/лунка. Смесь образцов состояла из конечной фиксированной концентрации VEGF-биотина (полученного в лаборатории) при 400 пМ и 15 точек последовательного разбавления антитела в соотношении 1:2, начиная с 20 нМ. Смесь образцов предварительно инкубировали в течение 1 часа до добавления в планшет и затем инкубировали в течение еще одного часа в планшете при комнатной температуре. После этого планшет 3 раза промывали с применением TBST и добавляли 20 мкл/лунка конъюгата стрептавидин-HRP, разбавленного при 1:5000, в течение времени инкубации, составляющего 1 час. Планшеты 3 раза промывали в TBST и затем добавляли 20 мкл/лунка субстрата TMB. TMB представляет собой хромоген, который приводит к получению синей окраски при окислении. TMB инкубировали в течение 10 минут до насыщения сигнала в образцах без антител и затем добавляли 10 мкл/лунка 2 н. серной кислоты, которая затем меняет синюю окраску на желтую, которая теперь характеризуется максимальным поглощением при 450 нм.

[661] На фиг. 9А-С показано, что оба биспецифических Fab-Fab и их соответствующий Fab к VEGF демонстрировали сопоставимую эффективность ингибирования связывания VEGF-A с VEGFR2.

Пример 9. Эффективность нейтрализации антител для блокирования ВТС-индуцируемой активации фосфо-ERK1/2 с применением скринингового анализа альфа

[662] ВТС способен связываться с рецепторами ErbB1 или ErbB4, которые затем способны образовывать гомодимеры или гетеродимеры с другими рецепторами ErbB. После димеризации рецепторы будут трансфосфорилироваться и способны передавать сигнал в пути MAPK/ERK. A431 (ATCC, № CRL-1555) представляет собой линию клеток эпидермоидной карциномы человека, которая характеризуется высокой экспрессией ErbB1 и характеризуется некоторой экспрессией ErbB3 и ErbB4. Эти клетки высевали в 384-луночный планшет при 17500 клеток/лунка в ростовую среду в инкубаторе для тканевых культур при 37°C, 5% CO₂. Через 24 часа среду удаляли и заменяли на 30 мкл бессывороточной среды DMEM, дополненной 0,05% BSA, и клетки затем "голодали" без сыворотки в течение 5 часов. Затем получали разбавления образцов в бессывороточной среде. ВТС человека разбавляли до концентрации 4 нМ. Тестируемые образцы получали при начальной концентрации 80 нМ и титровали при 9 точках титрования при разбавлениях 1:2. Контрольные образцы представляли собой бессывороточную среду и 4 нМ ВТС плюс 0 нМ тестируемого образца. Как ВТС, так и тестируемые образцы предварительно инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в смеси 1:1. 10 мкл смеси добавляли в каждую лунку, содержащую клетки, и обрабатывали в течение 5 минут при 37°C. Обработку немедленно прекращали и затем в каждую лунку добавляли 30 мкл лизирующего буфера 1 x SureFire Ultra, инкубировали планшет в течение 10 минут при комнатной температуре при осторожном встряхивании.

[663] Количественное определение уровня фосфорилированного ERK1/2 оценивали с применением набора AlphaLISA SureFire Ultra pERK. Анализ проводили в 384-луночных белых планшетах Proxiplate в соответствии с инструкциями изготовителя. 10 мкл образцов инкубировали с 5 мкл акцепторной смеси и 5 мкл донорной смеси в течение по меньшей мере двух часов при комнатной температуре в темноте. Планшет затем анализировали с помощью системы Envision с применением настроек AlphaScreen. Анализ данных процентного ингибирования рассчитывали в файле Excel. Значения IC₅₀ получали в GraphPad Prism 7.03 с применением модели нелинейной регрессии (аппроксимации кривой).

[664] Исходные данные необработанного контроля (A0) и контроля, обработанного лигандом ВТС (A100), из каждого планшета для анализа применяли для расчета % ингибирования тестируемых средств (A) на основании следующей формулы: % ингибирования = $(1 - (A - A0) / (A100 - A0)) * 100$. В этой формуле % ингибирования тестируемого средства линейно масштабировали между необработанным контролем (0%) и обработанным контролем (100%).

[665] На фиг. 10А-Д показано, что как биспецифические Fab-Fab, так и их

соответствующие Fab к ВТС демонстрировали сопоставимую эффективность подавления активации pERK.

Пример 10. Эффективность нейтрализации антител для блокирования ВТС-индуцируемой активации фосфо-HER3

[666] ВТС способен связываться с рецепторами ErbB1 или ErbB4, которые затем способны образовывать гомодимеры или гетеродимеры с другими рецепторами ErbB. После димеризации рецепторы будут трансфосфорилироваться и способны передавать сигнал в пути MAPK/ERK. Клетки NCI/ADR-RES (NCI) представляют собой линию клеток рака яичника. Эти клетки экспрессируют все 4 рецептора ErbB. ErbB3 (HER3) является каталитически неактивным и не способен трансактивировать другие рецепторы. Он подвергается трансактивации другими рецепторами.

[667] В анализе pHER3 получали последовательные разбавления Fab с начальной концентрацией 20 нМ при соотношении 1:2. Его предварительно инкубировали с 5 нМ растворимого ВТС человека с целью образования комплекса Fab-ВТС. Клетки высевали в 48-луночный планшет для тканевых культур и инкубировали в течение 24 часов, и клетки "голодали" без сыворотки в течение 5 часов до добавления комплекса антитело-ВТС. Среда для культивирования представляла собой 10% FBS в RPMI, и условия с "голоданием" без сыворотки обеспечивали с помощью среды OptiMem. Комплекс ВТС-антитело затем добавляли в 48-луночный планшет для тканевых культур, клетки в котором подвергали "голоданию" без сыворотки в течение 5 часов, и клетки с комплексом обрабатывали в течение 8 минут. После обработки надосадочную жидкость удаляли и клетки один раз промывали холодным 1X PBS. Затем клетки лизировали и фосфорилирование ErbB3 оценивали посредством MSD. Способ MSD заключался в том, что сначала антитело для захвата HER3 при 2 мкг/мл помещали в планшет при 10 мкл на лунку на 2 часа при комнатной температуре. Затем планшет один раз промывали с помощью 1XTBST и затем блокировали в 5% BSA (1XTBST) в течение 2 часов. Затем планшет промывали, добавляли тестируемый лизат при 10 мкл/лунка и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет затем промывали и добавляли антитело к pHER3, представляющее собой антитело для выявления, разбавленное 1:1000, при 10 мкл/лунка, и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшет промывали один раз и добавляли антитело кролика, помеченное меткой sulfotag, при разбавлении 1:5000 и при 10 мкл/лунка. Планшет промывали, добавляли буфер для анализа MSD и планшет анализировали на приборе для MSD.

[668] На фиг. 11A-D показано, что ингибирование 5 нМ ВТС индуцирует фосфорилирование ErbB3 в клетках ADR-RES. Как биспецифические Fab-Fab, так и их соответствующие Fab к ВТС демонстрировали сопоставимую эффективность ингибирования фосфорилирования ErbB3.

Пример 11. Эффективность нейтрализации антител для блокирования индуцирования активации фосфо-HER3 с помощью ВТС, связанного с мембраной, юкстакринным образом

[669] ВТС является представителем семейства EGF, который способен существовать в растворимой форме или в форме трансмембранного предшественника. Его трансмембранная форма способна подвергаться протеолитическому расщеплению металлопротеиназой ADAM10. Как растворимые, так и трансмембранные формы способны связывать ErbB1 и ErbB4 и передавать сигнал с помощью них. Целью следующего эксперимента является оценка эффективности биспецифических Fab-Fab по сравнению с их отдельными Fab к ВТС в ингибировании связывания и активации ВТС, связанного с мембраной, с клетками NCI/ADR-RES (NCI), которые содержат рецепторы ErbB.

[670] Нейтрализацию связывания ВТС, связанного с поверхностью, с его рецепторами проводили с применением клеток NCI/ADR-RES, которые экспрессировали рецепторы ErbB, и устойчивой линии клеток 293F-ВТС человека, которые экспрессировали ВТС, связанный с мембраной. Получали последовательные разбавления Fab с начальной концентрацией 20 нМ при 1:2. Затем разбавления Fab и клетки 293-ВТС предварительно инкубировали с целью обеспечения образования комплекса. Данный комплекс затем добавляли к клеткам ADR/RES и инкубировали в течение 10 минут при 37С. После обработки надосадочную жидкость удаляли и клетки один раз промывали холодным 1X PBS. Затем клетки лизировали и фосфорилирование ErbB3 оценивали посредством MSD. Способ MSD заключался в том, что сначала антитело для захвата HER3 при 2 мкг/мл помещали в планшет при 10 мкл на лунку на 2 часа при комнатной температуре. Затем планшет один раз промывали с помощью 1XTBST и затем блокировали в 5% BSA (1XTBST) в течение 2 часов. Затем планшет промывали, добавляли тестируемый лизат при 10 мкл/лунка и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет затем промывали и добавляли антитело к pHER3, представляющее собой антитело для выявления, разбавленное 1:1000, при 10 мкл/лунка, и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшет промывали один раз и добавляли антитело кролика, помеченное меткой sulfotag, при разбавлении 1:5000 и при 10 мкл/лунка. Планшет промывали, добавляли буфер для анализа MSD и планшет анализировали на приборе для MSD.

[671] На фиг. 12А-Д показано, что как биспецифические Fab-Fab, так и их соответствующие Fab к ВТС демонстрировали сопоставимую эффективность для ингибирования ВТС, связанного с мембраной, в клетках NCI/ADR-RES, которые содержат рецепторы ErbB.

Пример 12. Подавление ВТС-индуцируемой проницаемости в *in vitro* модели с применением целостности RPE

[672] Формирование плотных соединений клетками пигментного эпителия сетчатки (RPE) формирует *внешний* барьер между кровью и сетчаткой (BRB), который регулирует движение растворов и питательных веществ из сосудистой оболочки в *субретинальное* пространство. Он предотвращает утечку жидкости из сосудистой оболочки в сетчатку. В следующем анализе эффективность антител тестировали в

отношении их способности к нейтрализации BTC-индуцируемой проницаемости клеток RPE.

[673] Клетки RPE, дифференцированные из клеток iPS человека, характеризуются высокой экспрессией рецептора ErbB1. Обработка клеток RPE с помощью BTC была способна индуцировать проницаемость, как измерено по снижению сигнала устойчивости монослоя клеток. 384-луночный планшет xCELLigence E-plate (№ 5867681001) инициализировали посредством проведения измерения сигнала устойчивости (клеточного индекса) до добавления клеток. Клетки RPE высевали при 10000 клеток/лунка в ростовую среду (Lonza, № 195406, 2% FBS, 1X anti-anti № 15240062, 20 нг/мл FGF № PHG6015) и культивировали в инкубаторе для тканевых культур при 37°C, 5% CO₂. Клеткам обеспечивали дифференцировку посредством культивирования в течение 2-3 недель, меняя ростовую среду один раз в 2-3 дня. До начала эксперимента клетки культивировали в течение ночи на минимальной среде (Lonza, № 195406). Сигнал устойчивости в каждой лунке подвергали нормализации до 1 перед обработкой. Каждый день проводили обработки клеток RPE с помощью BTC и комплекса BTC/антитело [5 нМ/42,5 нМ] в свежей минимальной среде с измерением устойчивости один раз в 10 минут. Осуществляли построение графика зависимости нормализованного сигнала устойчивости от времени.

[674] На фиг. 13А показано, что как биспецифический Fab-Fab, так и его соответствующий Fab к BTC демонстрировали сопоставимую эффективность подавления BTC-индуцируемой проницаемости клеток RPE *in vitro*.

[675] Для внутренней целостности BRB HREC культивировали до образования плотных соединений. Обработка с помощью VEGF снижала устойчивость HREC, а обработка с помощью BTC не снижала ее. Как показано на фиг. 13В, NVS11, предварительно инкубированное с VEGF, ингибировало VEGF-индуцируемую проницаемость клеток HREC.

Пример 13. Комбинированная терапия с применением антитела к BTC и антитела к VEGF снижает утечку жидкости из сетчатки по сравнению со средствами монотерапии у крыс с диабетом

[676] В данном примере описано применение панкреатического токсина STZ (стрептозотоцина) для индуцирования гипергликемии у крыс. Через шесть недель гипергликемии утечка жидкости из сетчатки у таких животных повышается. Два антитела тестировали в отношении их способности снижать утечку жидкости из сетчатки: антитело к VEGF (4G3) и антитело к BTC (LZR230).

[677] 4G3 идентифицировали посредством пэннинга биотинилированного VEGF мыши с помощью Morphosys HuCAL Gold. Также было обнаружено, что Fab связывается с VEGF человека и нейтрализует его, и перекрестное взаимодействие человек/мышь делает его применимым в различных мышинных моделях. 4G3 представляет собой антитело VH5/V13, формат которого был изменен на человеческий и мышинный IgG1 и мышинный IgG2a. Мышинный IgG1 применяли в крысиных моделях STZ. 4G3 представляет собой

первичное выделенное антитело, а не антитело с созревшей аффинностью.

[678] LZR230 представляет собой полноразмерную IgG-версию Fab к BTC (SEQ ID NO: 180 и 181, или "TC16").

[679] Системное введение дозы антител к BTC (LZR230) или к VEGF (4G3) при 3 мг/кг в течение двух недель приводит к подавлению утечки жидкости из сетчатки по сравнению с IgG контрольных животных с гипергликемией. Комбинирование антитела к BTC с антителом к VEGF при 3 мг/кг приводит к дополнительным снижениям утечки жидкости из сетчатки.

[680] Отбирали коричневых норвежских крыс в возрасте от 8 до 10 недель или весом > 200 грамм. Гипергликемию индуцировали посредством разрушения инсулин-продуцирующих бета-клеток поджелудочной железы посредством однократной инъекции (ip) 65 мг/кг STZ. Животных считали животными с диабетом и включали в исследование, если уровни глюкозы в крови составляли > 250 мг/дл в течение 7 дней после инъекции STZ. STZ получают в 0,1 М буфере на основе цитрата натрия при pH 4,5. Контрольным животным путем инъекции вводили 0,1 М буфер на основе цитрата натрия при pH 4,5.

[681] Для оценки утечки жидкости из сетчатки крысам путем IV инъекции в хвостовую вену вводили FITC-декстран (4,4 кДа, 50 мг/мл в PBS, pH 7,4, 50 мг/кг веса тела). Через 25 мин крыс подвергали эвтаназии с помощью CO₂. Образцы крови собирали (0,5-1 мл) посредством сердечной пункции в пробирки, покрытые EDTA. Затем осуществляли перфузию 20 мл PBS по системной сосудистой сети через левый желудочек. Эта стадия облегчала удаление крови, которая содержит FITC-декстран, таким образом обеспечивая возможность количественной оценки FITC-декстрана, утечка которого произошла из крови в ткань сетчатки.

[682] Глаза извлекали и немедленно мгновенно замораживали на сухом льду перед хранением при -80°C. Из каждого глаза вырезали сетчатки, взвешивали и гомогенизировали в 150 мкл PBS, содержащего 2% Triton X-100. Для учета различий в инъекциях в хвостовую вену уровни FITC-декстрана в плазме крови учитывали при расчете для определения уровней FITC-декстрана в ткани сетчатки (мкг/г ткани). Длина волны возбуждения в спектрофотометре составляла 483 нм, а длина волны испускания составляла 538 нм. Количество FITC-декстрана, утечка которого произошла в глазную ткань, рассчитывали с применением следующего уравнения после коррекции по разбавлениям:

$$\text{Утечка жидкости из сетчатки} = \frac{\text{FITC-декстран в сетчатке (мкг)}}{\text{вес сетчатки (г)}} \\ (\text{мкл/г/мин}) \text{ FITC-декстран в плазме крови (мкг/мкл)} \times \text{время циркуляции (мин)}$$

[683] Для оценки роли BTC и VEGF в утечке жидкости из сетчатки антитела к BTC (LZR230) и/или к VEGF (4G3) вводили путем IP инъекции за 5 дней в течение 2 недель до конца эксперимента. Контрольные животные получали 6 мг/кг контрольного IgG. Антитело к BTC (LZR230) и антитело к VEGF (4G3) вводили путем инъекции при 3 мг/кг отдельно или в комбинации.

[684] Результаты. В четырех независимых экспериментах оценивали влияние 3

мг/кг антитела к BTC (LZR230), 3 мг/кг антитела к VEGF (4G3) и 3 мг/кг антитела к BTC (LZR230) + 3 мг/кг антитела к VEGF (4G3) по сравнению с контролем, представляющим собой IgG, на утечку жидкости из сетчатки у крыс с гипергликемией. Во всех четырех исследованиях утечка жидкости из сетчатки в значительной степени повышалась у животных с гипергликемией по сравнению с контролями. В двух из четырех исследований антитело к BTC (LZR230) отдельно или антитело к VEGF (4G3) отдельно в значительной степени снижали утечку жидкости из сетчатки. Во всех четырех исследованиях комбинированная обработка с помощью антитела к BTC (LZR230) и антитела VEGF (4G3) в значительной степени подавляла утечку жидкости из сетчатки по сравнению с контролем, представляющим собой IgG. GraphPad Prism (Ла Хойя, Калифорния, США) применяли для нанесения данных на график и выполнения статистических анализов. Каждый глаз обрабатывали как независимую точку данных. Проводили сравнения с контрольным STZ (IgG) посредством однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с критерием множественных сравнений Даннетта. Значимость составляла $P < 0,05$, если не указано иное. Индуцирование гипергликемии с помощью STZ приводило к значительному повышению утечки жидкости из сетчатки по сравнению с нормогликемическими животными. Обработка с помощью антитела к VEGF (4G3) приводила к 32% снижению утечки жидкости из сетчатки. Обработка с помощью антитела к BTC (LZR230) приводила к 41% снижению утечки жидкости из сетчатки. Комбинация антитела к BTC (LZR230) и антитела к VEGF (4G3) неожиданно приводила к 77% снижению утечки жидкости из сетчатки.

[685] На фиг. 14 показано, что индуцируемая гипергликемией утечка жидкости из сетчатки контролируется как BTC, так и VEGF, и клиническое нацеливание на оба из BTC и VEGF приведет к большей эффективности, чем нацеливание только на VEGF.

Пример 14. Эффективность биспецифических Fab к BTC/VEGF при обработках с помощью BTC или VEGF

[686] Способы и животная модель. Исследования *in vivo* проводили на самцах голландских поясных кроликов, вес которых составлял примерно 1,6-2,2 кг.

[687] Подготовка животных к интравитреальным инъекциям или визуализации. Глаза кролика расширяли посредством местного введения 1% циклопентолата и фенилэфрина (применяли концентрацию 2,5 или 10% в зависимости от доступности) и роговицу анестезировали посредством местного введения 0,5% пропаракаина. Кроликов затем анестезировали посредством *i.m.* инъекции смеси, содержащей кетамин (17,5-35 мг/кг) и ксилазин (2,5-5 мг/кг).

[688] Интравитреальная инъекция тестируемого препарата кроликам. При прямой визуализации с помощью хирургического микроскопа путем инъекции вводили 50 мкл тестируемого препарата в стекловидное тело с помощью иглы 30 калибра, вводимой супратемпорально ~2 мм от лимба в центральную часть стекловидного тела. В ходе инъекции регистрировали любые осложнения, связанные с инъекцией (кровоизлияние, отслоение сетчатки, повреждение хрусталика или регургитация жидкости), и затем

процедуру повторяли на другом глазу из пары. В исследованиях, где инъекцию VEGF проводили менее чем через две недели, после процедуры на оба глаза наносили мазь, содержащую 0,3% тобрамицина. Если инъекцию VEGF проводили более чем через две недели после инъекции тестируемого препарата, после процедуры на оба глаза наносили мазь, содержащую 0,3% тобрамицина и 0,1% дексаметазона.

[689] Интравитреальные инъекции VEGF/BTC кроликам. Изменения сосудов сетчатки или морфологические изменения индуцировали с применением интравитреальной (IVT) инъекции объемом 50 мкл, содержащей 400 нг VEGF-A человека (изоформы 165), в физиологическом растворе (Perrotech, номер по каталогу AF-100-20) или с применением интравитреальной (IVT) инъекции объемом 50 мкл, содержащей 0,75 мкг BTC человека, в физиологическом растворе соответственно. Процедура была такой же, как процедура, описанная в предыдущем разделе, за исключением того, что после процедуры на оба глаза наносили мазь, содержащую 0,3% тобрамицина (без дексаметазона).

Эффективность биспецифических Fab к BTC/VEGF при обработке с помощью BTC

[690] Получение изображений для определения толщины сетчатки и количественное определение, оцененное посредством оптической когерентной томографии (ОСТ). ОСТ-изображения сетчатки кролика получали с применением системы Heidelberg SPECTRALIS[®] для ОСТ (Heidelberg Engineering; Франклин, Массачусетс, США). Осуществление ОСТ состояло из получения семи b-сканов высокого разрешения с в среднем 30 кадрами на b-scan (30 × 10 градусов). Скан центрировали ниже головки зрительного нерва и вращали вертикально до тех пор, пока длинная ось скана не была выровнена перпендикулярно медуллярным лучам. Описанный участок охватывает зрительную полосу кролика, которая, как известно, характеризуется высокой плотностью m-колбочек и ганглиозных клеток (Juliusson et al., 1994). Прибор автоматически регистрирует область ОСТ-скана каждой сетчатки, поэтому последующие изображения получают в том же участке.

[691] Количественное определение толщины сетчатки с помощью ОСТ-изображений. Изображения экспортировали из программного обеспечения Heidelberg в формате.tif. Собственный алгоритм создавали в MATLAB[®] (Нейтик, Массачусетс) для обрезки и извлечения ОСТ-изображений из файла.tif. Морфометрический анализ проводили в отношении выделенных ОСТ-изображений в MATLAB[®] посредством ручного сегментирования слоев сетчатки. Линии прослеживали вдоль внутренней мембраны сетчатки, мембраны Бруха и на границе сосудистой оболочки и склеры. Проксимальное отличие между этими линиями применяли для получения значений толщины сетчатки и сосудистой оболочки (толщина сетчатки включает RPE). Края ОСТ-изображений часто захватывали небольшую часть головки нерва или характеризовались артефактами, связанными с визуализацией, поэтому код писали для обрезки внешних 25% каждого изображения, оставляя центральные 50% для экспорта для анализа. Значения конвертировали из пикселей в мкм для окончательного вывода. Несмотря на то, что IVT

инъекция ВТС индуцирует утолщение как сетчатки, так и RPE, в исследованиях, описанных в данном документе, измеряли и количественно анализировали только толщину сетчатки.

[692] Исследования эффективности. Тестируемый препарат вводили путем инъекции в день 0 непосредственно после осуществления ОСТ перед инъекцией на исходном уровне. Другое ОСТ-изображение последовательно получали в день 7 непосредственно перед инъекцией ВТС для индуцирования утолщения сетчатки/RPE. Конечное ОСТ-изображение получали в день 14. Измеряли изменение толщины сетчатки (разницу между днем 14 и днем 0) и сравнивали между группами. Процент ингибирования рассчитывали для каждой группы обработки посредством определения разницы в среднем изменении толщины сетчатки между этой группой обработки и группой, обработанной физиологическим раствором (отрицательный контроль).

Эффективность биспецифических Fab к ВТС/VEGF при обработке с помощью VEGF

[693] Получение изображений. Изменения VEGF-индуцируемой проницаемости сосудов сетчатки оценивали посредством флуоресцентной ангиографии на основе сканирующей лазерной офтальмоскопии (SLO). Изображения получали для двух флуоресцентных красителей, выбранных либо для мечения архитектуры сосудов (декстран, конъюгированный с FITC), либо для определения проницаемости сосудов (флуоресцеин). Для получения изображений использовали канал флуоресцеина в 6-режимной системе SPECTRALIS® (Heidelberg Engineering). За примерно 5 минут до получения изображений посредством i.v. инъекции 1 мл раствора FITC-конъюгированного декстрана с молекулярной массой 2000 кДа доставляли в краевую ушную вену. Этот высокомолекулярный краситель остается в сосудах, и следовательно, позволяет захватывать карту архитектуры сосудов. Концентрацию используемого FITC-декстрана (35-70 мг/мл) подбирали эмпирически для каждой партии, исходя из флуоресцентного сигнала, необходимого для получения высококачественных изображений (Sigma, FD2000s). Изображения меченой сосудистой сети сетчатки обоих глаз получали до следующей стадии. Затем оценивали проницаемость сосудов сетчатки посредством инъекции 0,3 мл низкомолекулярного красителя, для которого известно, что происходит его утечка из сосудов после инъекции VEGF (10% раствор флуоресцеина натрия). Краситель доставляли внутривенно в краевую ушную вену, при этом изображения получали через примерно 3 минуты после инъекции в один глаз и через примерно 4-6 минут после инъекции в другой глаз из пары. Экспортированные изображения представляли собой среднее из до 40 зарегистрированных SLO-изображений, полученных с помощью 30-градусной линзы, центрированной на назальные медуллярные лучи, прилегающие к зрительному нерву.

[694] Количественное определение проницаемости сосудов сетчатки. Анализ изображений проводили на рандомизированных данных в слепом режиме. Проницаемость сосудов количественно определяли посредством обработки изображения, полученного

через 48 часов после введения VEGF с FITC-декстраном, в сочетании с соответствующим изображением, полученным с применением флуоресцеина, в тот же день для того же глаза. Обработку изображений осуществляли с применением программного обеспечения, рутинно разработанного в MATLAB[®]. Сначала изображения совмещали друг с другом. Участок, содержащий зрительный нерв и область снаружи от медулярного луча, затем вырезали из совместно совмещенных изображений наряду с любыми локальными участками с недостаточным качеством изображения для анализа. Нормализованные совместно совмещенные изображения затем вычитали друг из друга на основании попиксельного анализа. Так как изображение, полученное с применением FITC-декстрана, демонстрировало только меченые сосуды, а изображение, полученное с применением флуоресцеина, демонстрировало сигнал в сосудах, а также краситель, вытекший из сосудов, вычитание изображения, полученного с применением FITC-декстрана, из изображения, полученного с применением флуоресцеина, приводило к получению изображения, демонстрирующего только флуоресцеин, вытекший из сосудов. Полученную интенсивность флуоресценции флуоресцеина на единицу площади из рассчитанного изображения указывали как "утечку флуоресцеина" для этого глаза. Средние значения утечки флуоресцеина для групп, в которых отсутствует ингибирование, как правило находятся в диапазоне от 0,3 до 0,5. Значительное подавление утечки флуоресцеина приводит к получению значений, близких к 0.

[695] Исследования эффективности. Повышение эффективности от применения тестируемых препаратов на основе антитела к VEGF оценивают в одной временной точке (день N), относящейся к дню осуществления IVT инъекций тестируемых препаратов (день 0). Утечку индуцируют посредством IVT доставки VEGF через несколько дней (день N-2). Интервал между инъекцией тестируемого препарата и инъекцией VEGF варьируется в зависимости от требований исследования. Однако визуализацию оценки утечки флуоресцеина всегда осуществляют через два дня после инъекции VEGF, независимо от продолжительности исследования.

[696] Статистический анализ. GraphPad Prism (Ла Хойя, Калифорния, США) применяли для нанесения данных на график и выполнения статистических анализов. Каждый глаз обрабатывали как независимую точку данных. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку, если не указано иное. Значимость составляла $P < 0,05$, если не указано иное. Толщину сетчатки измеряли для центрального линейного скана (4 из 7 сканов) во всех временных точках. Изменение толщины сетчатки со дня 0 (исходный уровень до IVT инъекции тестируемого препарата) до дня 14 (14 дней после инъекции тестируемого препарата и 7 дней после инъекции ВТС) измеряли для антител и физиологического раствора (отрицательный контроль). Если точки данных субъекта были недоступны во всех временных точках, то этого субъекта удаляли из анализа. Расчеты средней утечки флуоресцеина или утолщения сетчатки, ингибирования относительно контролей (%) и статистических показателей выполняли в группах, состоящих из отдельных глаз. Проводили сравнения с отрицательным контролем посредством

однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с критерием множественных сравнений Даннетта.

[697] На фиг. 15А показаны иллюстративные OCT-изображения глаза кролика, полученные на исходном уровне (слева), через 2 дня после обработки с помощью 400 нг VEGF (центр) и через 7 дней после обработки с помощью 750 нг ВТС (справа). 750 нг ВТС индуцировали значительное утолщение сетчатки (48 микрон) в день 7, а 400 нг VEGF индуцировали минимальное утолщение сетчатки (9 микрон) через 2 дня после инъекции. Срезы сетчатки внизу одних и тех же глаз демонстрируют патологию. Интравитреальный ВТС индуцирует субретинальный отек и изменения RPE у кроликов, при этом VEGF не индуцирует их. С целью оценки эффективности NVS1, блокирующего эффекты ВТС *in vivo*, NVS1 вводили путем IVT инъекции за 7 дней до IVT инъекции ВТС. Изменения толщины сетчатки оценивали через 7 дней после инъекции ВТС. NVS1 в значительной степени подавляло утолщение сетчатки в глазах, обработанных с помощью ВТС (85-87% с 61 мкг/глаз NVS11 (~40 мкг/мл в 1,5 мл стекловидного тела кролика), $p < 0,0001$, $n=2$; 30% с 6,1 мкг/глаз NVS11, $p < 0,01$, $n=1$ исследование) (фиг. 15В).

[698] На фиг. 16 показано изменение значений толщины сетчатки каждого глаза (общая толщина между днем 14 и днем 0) для каждой группы обработки (только ВТС, две дозы NVS1-3 и 30 мкг, молярно эквивалентные дозы составляют 6,1 и 61 мкг NVS11). Обе дозы NVS11 и NVS1 в значительной степени снижали утолщение сетчатки дозозависимым образом. Снижение утолщения сетчатки, наблюдаемое в глазах животных, получающих биспецифическую молекулу NVS11, было сопоставимым со снижением, которое было достигнуто при эквимолярной дозе NVS1.

[699] На фиг. 17 показано изменение толщины сетчатки каждого глаза (общая толщина со дня 14 до дня 0) для каждой группы обработки (только ВТС, две дозы NVS2-3 и 30 мкг, молярно эквивалентные дозы составляют 6,1 и 61 мкг NVS12). ВТС-индуцируемое утолщение сетчатки в значительной степени ингибировалось биспецифической молекулой NVS12 дозозависимым образом. Снижение, наблюдаемое в группе, получающей биспецифическую молекулу, было сопоставимым со снижением, наблюдаемым в группах, обработанных соответствующим антителом к ВТС.

[700] На фиг. 18А показано изменение толщины сетчатки каждого глаза кролика (день 14 - день 0) для разных групп обработки (только ВТС, 30 мкг молярно эквивалентных доз NVS11, NVS12 и их соответствующих молекул NVS1 и NVS2 соответственно). Оба биспецифических антитела, 70 мкг NVS12 и 61 мкг NVS11, в значительной степени подавляли ВТС-индуцируемое утолщение сетчатки глаз кролика, что сопоставимо с примерно эквимолярными дозами их соответствующей молекулы, 30 мкг NVS1 и NVS2 соответственно.

[701] IVT инъекция ВТС человека при 0,75 мкг/глаз повышала толщину сетчатки на ~36 мкм через 7 дней (RD-2017-00326, $p < 0,0001$). Гистологическое исследование позволило выявить ВТС-индуцируемые изменения RPE, включая гипертрофию, вакуолизацию, изменения пигментации, складчатость сетчатки и субретинальный отек

(фиг. 18В (сравнение кролика, которому путем инъекции вводили физиологический раствор, на панели А, с кроликом, которому путем инъекции вводили ВТС, на панели В)). ВТС-индуцируемые гистологические изменения предотвращались у кроликов, которым вводили 61 мкг NVS11 (фиг. 18В, панель С). Гистологический анализ сетчатки кролика, показанный на фиг. 18В В-D, соответствует ОСТ-изображениям кролика, показанным на фиг. 15В. Фиг. 18В: панели гистологического анализа сетчатки кроликов, которым путем IVT инъекции вводили: А) физиологический раствор. В) ВТС. С) ВТС+61 мкг NVS11. D) ВТС+30 мкг NVS1 (положительный контроль). Слой RPE показан на каждой панели толстой горизонтальной красной стрелкой. ВТС-индуцируемые изменения RPE обозначены тонкими красными стрелками.

[702] IVT инъекция VEGF-А человека (400 нг/глаз) индуцирует утечку жидкости через сосуды сетчатки, что подтверждается результатами ангиографии с применением флуоресцеина (фиг. 18С). С целью оценки эффективности NVS11, блокирующего эффекты VEGF *in vivo*, кроликам путем IVT инъекции вводили NVS11 за 14 дней до обработки с помощью VEGF-А посредством IVT инъекции при 400 нг/глаз. Изменения утечки жидкости из сетчатки оценивали через 2 дня после обработки с помощью VEGF. NVS11 эффективно снижало VEGF-индуцируемую утечку жидкости через сосуды сетчатки (снижение на 79%, $p < 0,0001$, $n=2$ исследования), сходно с эквимоллярной дозой соответствующего Fab к VEGF (NVS8), снижающего утечку флуоресцеина на 80% ($p < 0,0001$) (фиг. 18D).

[703] На фиг. 19 показаны иллюстративные изображения, полученные посредством ангиографии с применением флуоресцеина через 2 дня после IVT доставки 400 нг VEGF (слева) и через 7 дней после доставки 750 нг ВТС (справа). Инъекция VEGF вызывает утечку жидкости через сосуды сетчатки кроликов, а инъекция ВТС не вызывает ее.

[704] На фиг. 20 показаны значения утечки флуоресцеина ($t=3-5$ мин) в отдельных глазах из разных групп обработки (обработанных только с помощью VEGF или обработанных эквимоллярными дозами NVS11, NVS12 и NVS8). IVT введение осуществляют следующим образом: день 0: биспецифический (30,5 мкг на глаз) и отдельный fab (15 мкг на глаз); день 14: VEGF (0,4 мкг на глаз); день 16: визуализацию посредством сканирующей лазерной офтальмоскопии осуществляли для оценки утечки флуоресцеина, индуцированной инъекцией VEGF. Получали по два изображения на глаз. Методика, которую применяли для получения изображений, представляла собой ангиографию с применением флуоресцеина (FA). FD (относится к изображению, полученному до инъекции флуоресцеина) - изображение, полученное с применением мечения FITC-декстраном, позволило выявить архитектуру кровеносных сосудов, и FA осуществляли после инъекции флуоресцеина для определения утечки. Конечные лекарственные средства относятся к сбору данных РК для определения уровней лекарственного средства в глазу. Утечка жидкости из сосудов сетчатки в значительной степени подавлялась обеими биспецифическими молекулами и их соответствующей молекулой к VEGF, NVS8. Данный результат подтверждали в двух исследованиях.

[705] На фиг. 21 показана утечка флуоресцеина ($t=3-5$ мин) в глазах отдельных животных, которым путем инъекции вводили физиологический раствор, 30,5 мкг NVS11, 30,5 мкг NVS12 и 15 мкг NVS8. Хотя все три Fab демонстрируют снижение утечки флуоресцеина, две биспецифические конструкции, NVS11 и NVS12, демонстрируют большее снижение, чем NVS8, Fab к VEGF.

[706] На фиг. 22 показано изменение общих значений толщины сетчатки отдельных глаз, обработанных физиологическим раствором, 50 и 500 мкг луцентиса (ранибизумаб; Fab к VEGF) или 50 мкг NVS1 (Fab к BTC). 50 мкг NVS1 в значительной степени подавляли BTC-индуцируемое утолщение сетчатки, в то время как обе дозы Fab к VEGF были неспособны подавлять BTC-индуцируемое утолщение сетчатки. Данный результат подтверждали в двух исследованиях.

Пример 15. Модель PD in vivo BTC-индуцируемое утолщение сетчатки у кролика

[707] Интравитреальная (IVT) инъекция BTC кроликам приводит к утолщению сетчатки, как выявлено посредством оптической когерентной томографии (ОСТ). Антитела, протестированные в исследовании, включали: NVS1, исходное антитело для NVS1 ("PNVS1"; SEQ ID NO: 168 и 169), Mor3207 для отрицательного контроля. Вкратце, в день 0 осуществляли измерения посредством ОСТ на исходном уровне до IVT инъекции BTC и/или соединения.

[708] Исследование включало 6 групп кроликов: 1) 0,75 мкг rhBTC/глаз ($n=4$); 2) 500 мкг NVS1/глаз ($n=3$); 3) 0,75 мкг rhBTC+500 мкг NVS1/глаз ($n=4$); 4) 500 мкг PNVS1 ($n=3$); 5) 0,75 мкг rh BTC+500 мкг PNVS1/глаз ($n=4$); 6) 0,75 мкг rhBTC+500 мкг Mor3207/глаз ($n=4$).

[709] В день 7 проводили ОСТ-анализ до эвтаназии и сбора глазных тканей для гистологического анализа и анализа РК. Кролики, которым путем инъекции вводили NVS1 или PNVS1, предварительно инкубированные с BTC, демонстрировали значительно меньшее BTC-индуцируемое утолщение сетчатки (в обоих случаях $p < 0,001$) по сравнению с BTC, вводимым отдельно. Средняя толщина сетчатки была сходна со значениями на исходном уровне после инъекции NVS1 или PNVS1 по отдельности. Кролики, которым путем инъекции вводили Mor3207, предварительно инкубированное с BTC, демонстрировали значительно большее утолщение сетчатки ($p < 0,01$) по сравнению с BTC, вводимым отдельно. Изменения толщины сетчатки относятся к толщине сетчатки каждого животного до IVT инъекции.

[710] На фиг. 23 показано, что оба NVS1 и PNVS1 в значительной степени снижали толщину сетчатки кроликов относительно необработанного контроля и отрицательного контроля. Группы сравнивали посредством однофакторного ANOVA с пост-тестом Даннетта ($P < 0,05$ =значимая разница).

[711] После подробного описания настоящего изобретения станет очевидно, что модификации, вариации и эквивалентные аспекты возможны без отступления от сущности и объема настоящего изобретения, описанного в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения. Кроме того, следует понимать, что все примеры в настоящем

изобретении представлены в качестве неограничивающих примеров.

Пример 16. Исследование на людях

[712] Исследование на людях проводят для оценки безопасности и переносимости полиспецифических антител к BTC/VEGF, описанных в данном документе, например, NVS11-NVS14, после введения однократной интравитреальной (IVT) дозы не более 24 участникам с DME, RVO и/или неоваскулярной AMD. Участники, подходящие для включения в данное исследование, соответствуют всем из следующих критериев.

1) Участники с макулярным отеком по меньшей мере одного глаза включали участников с фокальным или диффузным DME, неоваскулярной AMD или RVO;

2) Буквенный показатель раннего лечения диабетической ретинопатии (ETDRS) исследуемого глаза хуже чем 60 букв (20/63), но лучше чем 24 буквы (20/320), при скрининге и на исходном уровне; показатель ETDRS неисследуемого глаза составляет ≥ 60 букв при скрининге и на исходном уровне;

3) Достаточно чистая глазная среда и адекватное расширение зрачка для получения фотографий глазного дна достаточной четкости для измерения диаметров артерий и вен сетчатки;

4) Показатели жизненно важных функций находятся в пределах нормальных диапазонов в положении сидя при скрининге и на исходном уровне (перед инъекцией): температура тела при пероральном измерении составляет от 35,0 до 37,5°C; систолическое давление крови составляет 90-160 мм. рт. ст.; диастолическое кровяное давление составляет 50-100 мм. рт. ст., и частота пульса составляет 40-90 ударов в минуту, и

[713] Ключевые критерии исключения данного исследования включают пролиферативную диабетическую ретинопатию исследуемого глаза. В качестве исключения допускается следующее.

Пучки неоваскуляризации в менее чем одной области диска без кровоизлияния в стекловидное тело, и

Фокальные периферические области сетчатки, обработанные посредством фотокоагуляции, с менее чем 30 лазерными ожогами, появившимися за по меньшей мере шесть месяцев до дня 1.

[714] Другие критерии исключения включают следующее.

Пациенты с диабетом 1 типа или 2 типа, которые характеризуются уровнем гемоглобина A1C ≥ 12 при скрининге;

другие глазные и системные состояния.

[715] Это исследование является открытым. Никто из субъектов, спонсорского персонала или исследователей не ослеплен в отношении назначенного лечения или уровня дозы. В данном исследовании принимают участие в целом не более 24 участников с возможным добавлением участников японского происхождения при необходимости при наиболее высоком переносимом уровне дозы. Размер выборки (N) основан на заключениях осуществимости и стандартной практике в первых исследованиях на людях для определения характеристик безопасности и фармакокинетики (PK).

[716] Всего в исследовании принимают участие до четырех когорт с дополнительной необязательной когортой с самой низкой или промежуточной дозой из шести участников. В одном аспекте план исследования с повышением дозы включает следующие когорты.

Когорта 1: 0,25 мг/глаз, N=3;

Когорта 2: 0,75 мг/глаз, N=3;

Когорта 3: 2,5 мг/глаз, N=6;

Когорта 4: 7,5 мг/глаз, N=6, и

Когорта 5: необязательная когорта с промежуточной дозой.

[717] В одном аспекте однократную дозу полиспецифического антитела к VEGF/VEGF, описанного в данном документе, например, NVS11-NVS14, вводят интравитреально в исследуемый глаз на исходном уровне/в день 1. Период последующего наблюдения длится до дня 60/конца исследования (EOS).

[718] Как указано выше, в одном аспекте тестируют четыре уровня дозы/когорты при 0,25, 0,75, 2,5 и 7,5 мг/глаз. В одном аспекте IVT дозы доставляют в объеме 50 мкл.

[719] Перед переходом на более высокую дозу проводят обзор всех данных по безопасности и переносимости. Временную точку для повышения дозы выбирают в день 15, когда все три участника в когорте 1, два из трех участников в когорте 2 и четыре из шести участников в когортах 3 и 4 достигли дня 15. Оценивают следующие наборы данных, включая период последующего наблюдения до дня 15 при обзоре повышения дозы: показатели жизненно-важных функций (температуру тела, кровяное давление и частоту пульса), ECG, лабораторные исследования безопасности, остроту зрения, IOP, нежелательные явления, изменения толщины сетчатки и ангиографию с применением флуоресцеина.

[720] В случае заметных нежелательных явлений или проблем с безопасностью во время повышения дозы в ходе исследования рассматривают следующие изменения до следующего запланированного уровня дозы: введение промежуточной дозы между текущей и предыдущей дозой; включение дополнительных участников для текущей или предыдущей более низкой дозы и/или прекращение любого дополнительного повышения дозы.

[721] Первичные показатели исхода данного исследования включают определение количества участников с нежелательными явлениями со стороны глаз и нежелательными явлениями не со стороны глаз (с дня 1 по день 60). Оценка включает безопасность и переносимость однократной IVT дозы в течение двух месяцев посредством обзора офтальмологического медицинского обследования и лабораторной безопасности. Конечные точки первичных показателей исхода включают:

Определение характеристик безопасности в отношении глаз и не в отношении глаз по частоте проявления нежелательных явлений, возникающих во время лечения (AE) (новых или ухудшающихся по сравнению с исходным уровнем), категориально обобщенных по классам систем органов и/или предпочтительному термину, и

Измерение изменений по сравнению с исходным уровнем следующего: показателей жизненно-важных функций, ECG, лабораторной безопасности, IOP, BCVA и толщины макулярной области, измеренной посредством SD-OCT.

[722] Вторичные показатели исхода данного исследования включают профиль РК полиспецифического антитела к BTC/VEGF, описанного в данном документе (например, NVS11-NVS14), после введения однократной IVT дозы, при этом конечные точки включают общую концентрацию антител в сыворотке крови, описанную посредством параметров РК, включающих без ограничения C_{max}, T_{max}, T_{1/2}, AUC_{last} и AUC_{inf}, все из которых находятся в пределах временного промежутка, состоящего из дней 1, 2, 5, 15, 29, 43 и 60.

Таблица 4. Различные последовательности

SEQ ID NO: 156	ProBTC человека	MDRAARCSGASSLPLLLALALGLVILHCVVAD GNSTRSPETNGLLCGDPEENCAATTTQSKRKGH FSRCPKQYKHYCIKGRCRFVVAEQTPSCVCDEG YIGARCERVDLFYLRGDRGQILVICLIAVMVFI ILVIGVCTCCHPLRKRKRKKEEEMETLGKDI TPINEDIEETNIA
SEQ ID NO: 157	Экспрессируемый BTC человека (D32-Y111)	MDGNSTRSPETNGLLCGDPEENCAATTTQSKR KGHFSRCPKQYKHYCIKGRCRFVVAEQTPSCV CDEGYI GARCERVDLFYhhhhh
SEQ ID NO: 158	BTC человека	DGNSTRSPETNGLLCGDPEENCAATTTQSKRKG HFSRCPKQYKHYCIKGRCRFVVAEQTPSCVCDE GYI GARCERVDLFY
SEQ ID NO: 159	Константная область каппа-цепи иммуноглобулина человека	KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 160	Первый константный Ig-домен тяжелой цепи иммуноглобулина	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKRVE PKSC

	улина человека	
SEQ ID NO: 161	Линкер	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 162	Линкер	GGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 163	Линкер	GGGSGGGGSGS
SEQ ID NO: 164	Линкер	EAAAK
SEQ ID NO: 165	Линкер	GSGGG
SEQ ID NO: 166	Линкер	GSGG
SEQ ID NO: 167	Линкер	SGGGSGGGSGGG

Таблица 5. Последовательности исходных антител к BTC и антител к BTC с созревшей аффинностью

Исходное антитело к NVS1		
SEQ ID NO: 168	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGGTFNDY</u> <u>AISWVRQAPGGLEWMGGIIPIFGNANYAQKFQ</u> <u>GRVTITADESTSTAYMELSSLRSED</u> <u>TA VYYCAR</u> <u>SSSTYGIHAFDYWGQ</u> <u>GLVTVSSASTKGPSVFP</u> LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS
SEQ ID NO: 169	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISINFLN</u> WYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYDDEFPMTFGQ</u> GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Вариант NVS1 с созревшей аффинностью		
SEQ ID NO: 170	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGGTFSSY</u> <u>AISWVRQAPGGGLEWMGGIVPWMGIPVYAQK</u> <u>FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED</u> <u>TA VYYC</u> <u>ARSSSTYGIHAFDYWGQ</u> <u>GLVTVSSASTKGPSV</u> FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
SEQ ID NO: 171	Легкая цепь	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISINFLN</u>

	(<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	WYQQKPGKAPKLLIYAASN <u>LQSGVPSR</u> FSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQYDD</u> FPMTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Исходное антитело к NVS2		
SEQ ID NO: 172	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	EVQLLES <u>GGGLVQP</u> GGSLRLSCAASGFTFSSYA <u>MSWVRQAPGK</u> GLEWVSAISGSGGSTYYADSV <u>KGRFTISR</u> DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQRY</u> YFGEFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
SEQ ID NO: 173	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC <u>SGDKLGD</u> KYAY WYQQKPGQSPVLVIY <u>QDSKR</u> PSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAED ^E ADYYC <u>QLYD</u> YLSSTGVF GGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEA
Вариант NVS2 с созревшей аффинностью (TC15)		
SEQ ID NO: 174	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	EVQLLES <u>GGGLVQP</u> GGSLRLSCAASGFTFSSYA <u>MSWVRQAPGK</u> GLEWVSAISGSGGSTYYADSV <u>KGRFTISR</u> DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQRY</u> YFGEFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 175	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC <u>SGDKLGD</u> KYAY WYQQKPGQSPVLVIY <u>QDSKR</u> PSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAED ^E ADYYC <u>STFDYK</u> LSLGVF GGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ

		VTHEGSTVEKTVAPTECS
Вариант NVS2 с созревшей аффинностью		
SEQ ID NO: 176	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>EVQLLES</u> GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA <u>MSWVRQAPGK</u> GLEWVSAISGSGGSTYYADSV <u>KGRFTISR</u> DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQRY</u> YFGFE DL WGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 177	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC <u>SGDKLGD</u> KYAY WYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAEDEADYYCQAFDYRSSGV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
Вариант NVS2 с созревшей аффинностью		
SEQ ID NO: 178	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>EVQLLES</u> GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA <u>MSWVRQAPGK</u> GLEWVSAISGSGGSTYYADSV <u>KGRFTISR</u> DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQRY</u> YFGFE DL WGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 179	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC <u>SGDKLGD</u> KYAY WYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAEDEADYYCQAFDYKSDVGV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
Вариант NVS2 с созревшей аффинностью (TC16)		
SEQ ID NO: 180	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>EVQLLES</u> GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA <u>MSWVRQAPGK</u> GLEWVSAISGSGGSTYYADSV

	<u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>KGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYC</u> <u>ARQRY</u> <u>YFGEFDLWGQ</u> <u>GLVTVSSASTKG</u> <u>PSVF</u> PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 181	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGD</u> <u>KYAY</u> WYQQKPGQSPVLVIIYQDSKRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAEDEADYYC <u>QA</u> <u>FSYL</u> <u>TSVGVF</u> GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS <hr/> SYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
Вариант NVS2 с созревшей аффинностью		
SEQ ID NO: 182	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>EVQLLES</u> <u>GGGLVQPGG</u> <u>SLRLSCAASGFTFSSYA</u> <u>MSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVSAISG</u> <u>SGGSTYYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYC</u> <u>ARQRY</u> <u>YFGEFDLWGQ</u> <u>GLVTVSSASTKG</u> <u>PSVF</u> PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 183	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGD</u> <u>KYAY</u> WYQQKPGQSPVLVIIYQDSKRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAEDEADYYC <u>QS</u> <u>FDYLYSSGVF</u> GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS <hr/> SYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
Вариант NVS2 с созревшей аффинностью		
SEQ ID NO: 184	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>EVQLLES</u> <u>GGGLVQPGG</u> <u>SLRLSCAASGFTFSSYA</u> <u>MSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVSAISG</u> <u>SGGSTYYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYC</u> <u>ARQRY</u> <u>YFGEFDLWGQ</u> <u>GLVTVSSASTKG</u> <u>PSVF</u> PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

SEQ ID NO: 185	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYAY WYQQKPGQSPVLVIY <u>QDSKRPSG</u> IPERFSGSNS GNTATLTISGTQAEDEADYYCQTFYYLSSLGVF GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
Вариант NVS2 с созревшей аффинностью		
SEQ ID NO: 186	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVS AI SGSGGSTYY ADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARQRY YFGEFDL WGQGT LTVVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSC
SEQ ID NO: 187	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYAY WYQQKPGQSPVLVIY <u>QDSKRPSG</u> IPERFSGSNS GNTATLTISGTQAEDEADYYCQAFDY LASSGVF GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
Вариант NVS2 с созревшей аффинностью		
SEQ ID NO: 188	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVS AI SGSGGSTYY ADSV KGAISGSGGSTYY ADSVKQRY YFGEFDL WGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDK RVEPKSC
SEQ ID NO: 189	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYAY WYQQKPGQSPVLVIY <u>QDSKRPSG</u> IPERFSGSNS GNTATLTISGTQAEDEADYYCQAFDY LHSIGVF GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT

		TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
Исходное антитело к NVS3		
SEQ ID NO: 190	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSSIVYDGSNTFYADSV</u> <u>KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC</u> ARDYLDFGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
SEQ ID NO: 191	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKIGKKYVHW YQQKPGQAPVLVIYDDSDRPSGIPERFSGSNSG NTATLTISGTQAEDEADYYCQAWDMQSVVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKAT LVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTEC
Вариант NVS3 с созревшей аффинностью (TC12)		
SEQ ID NO: 192	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA <u>MSWVRQAPGKGLEWVSGLGHVGYTTYTDSVK</u> <u>GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA</u> RDYLDFGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSV PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 193	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKIGKKYVHW YQQKPGQAPVLVIYDDSDRPSGIPERFSGSNSG NTATLTISGTQAEDEADYYCQAWDMQSVVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKAT LVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
Исходное антитело к NVS4		
SEQ ID NO: 194	Тяжелая	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW

	цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>ISWVRQAPGKGLEWVSYIDSWGSYTNYADSVK</u> <u>GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA</u> <u>RGGSLFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPS</u> SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
SEQ ID NO: 195	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISYLG WYQQKPGKAPKLLIYA <u>AASSLQSGVPSRFS</u> SGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQYDALNT</u> FGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEA
Вариант NVS4 с созревшей аффинностью		
SEQ ID NO: 196	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLS <u>CAASGFTFSRY</u> <u>WISWVRQAPGKGLEWVSYIDSWGSYTNYADS</u> <u>VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY</u> CARGGSLFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSC
SEQ ID NO: 197	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISYLG WYQQKPGKAPKLLIYA <u>AASSLQSGVPSRFS</u> SGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQYDDWD</u> TFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Вариант NVS4 с созревшей аффинностью		
SEQ ID NO: 198	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLS <u>CAASGFTFSRY</u> <u>WISWVRQAPGKGLEWVSYIDSWGSYTNYADS</u> <u>VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY</u> CARGGSLFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT

		QTYICNVNHHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 199	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISYLG WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYDDEDTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Вариант NVS4 с созревшей аффинностью		
SEQ ID NO: 200	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	QVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSRY WISWVRQAPGKGLEWVSYIDSGGTFINYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGGSLFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 201	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISYLG WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYDALNTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Вариант NVS4 с созревшей аффинностью (TC23)		
SEQ ID NO: 202	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	QVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSRY WISWVRQAPGKGLEWVSYIDSTGTFIHYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGGSLFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 203	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> ,	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISYLG WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYDALNTFGQG

	<u>CDR3</u>)	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Вариант NVS4 с созревшей аффинностью		
SEQ ID NO: 204	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>QVQLLES</u> GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSR <u>Y</u> <u>WISWVRQAPGKGLEWVSHIDSNSDWTSYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARGGSLFDY</u> WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 205	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISYLG WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQOYDALNTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Вариант NVS4 с созревшей аффинностью		
SEQ ID NO: 206	Тяжелая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	<u>QVQLLES</u> GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSR <u>Y</u> <u>WISWVRQAPGKGLEWVSHIN</u> YEGTWTLYADS <u>VKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARGGSLFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 207	Легкая цепь (<u>CDR1</u> , <u>CDR2</u> , <u>CDR3</u>)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISYLG WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQOYDALNTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

Пронумерованные варианты осуществления

[723] 1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с бетацеллюлином (BTC).

[724] 2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, которые блокируют связывание BTC с ErbB1, ErbB4 или ими обоими.

[725] 3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, которые блокируют BTC-индуцируемую активацию фосфо-ERK1/2.

[726] 4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-3, которые блокируют BTC-индуцируемую активацию фосфо-HER3.

[727] 5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент характеризуются константой диссоциации (KD), составляющей 5 пМ или меньше.

[728] 6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-5, которые связываются с BTC, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

[729] 7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 6, которые связываются с по меньшей мере одним остатком из SEQ ID NO: 157, выбранным из группы, состоящей из G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, R51, R53, F54, V56, A57, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76.

[730] 8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7, которые связываются с R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, Q59, T60, P61 и R73 из SEQ ID NO: 157.

[731] 9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-8, которые содержат определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (HCDR1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (HCDR2) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (HCDR3), представленные под SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно, и определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (LCDR1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (LCDR2) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (LCDR3), представленные под SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно.

[732] 10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 4, 2 и 3 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно.

[733] 11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где HCDR1 содержит консенсусную последовательность XYAIS, и/или HCDR2 содержит консенсусную последовательность GIXPXXGXXXYAQKFQG, и где X представляет собой любую аминокислоту и может не совпадать в разных

положениях.

[734] 12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 11, которые содержат последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 168 и последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 169 или последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 170 и последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 171.

[735] 13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 5, 6 и 3 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно.

[736] 14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 20, 18 и 16 соответственно.

[737] 15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 9-14, которые содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере приблизительно 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно.

[738] 16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 15, где различия в аминокислотной последовательности находятся не в пределах определяющих комплементарность областей.

[739] 17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 15, где различия в аминокислотной последовательности представляют собой консервативные замены.

[740] 18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 15, которые содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно.

[741] 19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 18, где VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 11 и 22 соответственно.

[742] 20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 12 и 23 соответственно.

[743] 21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 20, где тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 13 и 24 соответственно.

[744] 22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 9-21, которые содержат 1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в VH

с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10, и 2) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 21.

[745] 23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 22, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат:

- a. SEQ ID NO: 1, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно;
- b. SEQ ID NO: 4, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно;
- c. SEQ ID NO: 5, 6, 3, 17, 18 и 19 соответственно или
- d. SEQ ID NO: 7, 8, 9, 20, 18 и 16 соответственно.

[746] 24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-8, которые содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

a. HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 4, 5 и 7, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 6 и 8, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 9, и

b. LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 17 и 20, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 18, LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 19.

[747] 25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 24, которые содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно.

[748] 26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 25, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 12 и 23 соответственно.

[749] 27. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, которые содержат VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно.

[750] 28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7, которые связываются с P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76 из SEQ ID NO: 157.

[751] 29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 28, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 38, 39 и 40 соответственно.

[752] 30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 28, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 28, 26 и 27 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные

под SEQ ID NO: 38, 39 и 40 соответственно.

[753] 31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 28, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 29, 30 и 27 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 41, 42 и 43 соответственно.

[754] 32. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 28, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 44, 42 и 40 соответственно.

[755] 33. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 28-32, которые содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере приблизительно 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно.

[756] 34. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 33, где различия в аминокислотной последовательности находятся не в пределах определяющих комплементарность областей.

[757] 35. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 33, где различия в аминокислотной последовательности представляют собой консервативные замены.

[758] 36. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 33, которые содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно.

[759] 37. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 36, где VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 35 и 46 соответственно.

[760] 38. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 28-37, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 36 и 47 соответственно.

[761] 39. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 38, где тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с по меньшей мере приблизительно 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 37 и 48 соответственно.

[762] 40. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 28-39, которые содержат 1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в VH с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34, и 2) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 45.

[763] 41. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 40, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат:

- a. SEQ ID NO: 25, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно;
- b. SEQ ID NO: 28, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно;

c. SEQ ID NO: 29, 30, 27, 41, 42 и 43 соответственно или

d. SEQ ID NO: 31, 32, 33, 44, 42 и 40 соответственно.

[764] 42. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 28, которые содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

a. HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 28, 29 и 31, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 30 и 32, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 и 33, и

b. LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38, 41 и 44, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 и 42, LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40 и 43.

[765] 43. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 42, которые содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно.

[766] 44. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 43, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 36 и 47 соответственно.

[767] 45. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, которые содержат VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно.

[768] 46. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7, которые связываются с G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, R51, R53, F54 и V56 из SEQ ID NO: 157.

[769] 47. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 46, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 25, 49 и 50 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 58, 59 и 60 соответственно.

[770] 48. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 46, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 28, 49 и 50 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 58, 59 и 60 соответственно.

[771] 49. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 46, где HCDR1 содержит консенсусную последовательность XXAMX, и/или HCDR2 содержит консенсусную последовательность XXXX/-XXXXTXYXDSVKG, где X представляет собой любую аминокислоту и может не совпадать в разных положениях, и где X/- представляет собой любую аминокислоту или

делецию.

[772] 50. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 49, которые содержат последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 190 и последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 191.

[773] 51. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 46, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 29, 51 и 50 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 61, 62 и 63 соответственно.

[774] 52. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 46, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 31, 52 и 53 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 64, 62 и 60 соответственно.

[775] 53. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 46-52, которые содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно.

[776] 54. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 53, где различия в аминокислотной последовательности находятся не в пределах определяющих комплементарность областей.

[777] 55. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 53, где различия в аминокислотной последовательности представляют собой консервативные замены.

[778] 56. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 53, которые содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно.

[779] 57. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 56, где VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 55 и 66 соответственно.

[780] 58. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 46-57, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 56 и 67 соответственно.

[781] 59. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 58, где тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 57 и 68 соответственно.

[782] 60. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 46-59, которые содержат 1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в VH с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 54, и 2) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 65.

[783] 61. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту

осуществления 60, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат:

- a. SEQ ID NO: 25, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно;
- b. SEQ ID NO: 28, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно;
- c. SEQ ID NO: 29, 51, 50, 61, 62 и 63 соответственно или
- d. SEQ ID NO: 31, 52, 53, 64, 62 и 60 соответственно.

[784] 62. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 46, которые содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

a. HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 28, 29 и 31, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49, 51 и 52, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50 и 53, и

b. LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58, 61 и 64, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59 и 62, LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60 и 63.

[785] 63. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 62, которые содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно.

[786] 64. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 63, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 56 и 67 соответственно.

[787] 65. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с BTC, которые содержат VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно.

[788] 66. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7, которые связываются с S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, A57, Q59, T60, P61, A72, R73 и E75 из SEQ ID NO: 157.

[789] 67. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 66, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно.

[790] 68. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 66, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 72, 70 и 71 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно.

[791] 69. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 66, где HCDR2 содержит консенсусную последовательность

XIXXXXXXXXXYADSVKG, и/или LCDR3 содержит консенсусную последовательность QQYDXXXT, и где X представляет собой любую аминокислоту и может не совпадать в разных положениях.

[792] 70. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 69, которые содержат последовательность тяжелой цепи и легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

- a. SEQ ID NO: 194 и 195 соответственно;
- b. SEQ ID NO: 196 и 197 соответственно;
- c. SEQ ID NO: 198 и 199 соответственно;
- d. SEQ ID NO: 200 и 201 соответственно;
- e. SEQ ID NO: 202 и 203 соответственно;
- f. SEQ ID NO: 204 и 205 соответственно, и
- g. SEQ ID NO: 206 и 207 соответственно.

[793] 71. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 66, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 73, 74 и 71 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 85, 18 и 86 соответственно.

[794] 72. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 66, которые содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 75, 76 и 77 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 87, 18 и 84 соответственно.

[795] 73. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 66-72, которые содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

[796] 74. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 73, где различия в аминокислотной последовательности находятся не в пределах определяющих комплементарность областей.

[797] 75. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 73, где различия в аминокислотной последовательности представляют собой консервативные замены.

[798] 76. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 73, которые содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

[799] 77. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 76, где VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 79 и 89 соответственно.

[800] 78. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 66-77, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 80 и 90 соответственно.

[801] 79. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 78, где тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 81 и 91 соответственно.

[802] 80. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 66-79, которые содержат 1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в VH с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 78 и 2) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 88.

[803] 81. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 80, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат:

- a. SEQ ID NO: 69, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно;
- b. SEQ ID NO: 72, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно;
- c. SEQ ID NO: 73, 74, 71, 85, 18 и 86 соответственно или
- d. SEQ ID NO: 75, 76, 77, 87, 18 и 84 соответственно.

[804] 82. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7 и 66, которые содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

a. HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 69, 72, 73 и 75, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70, 74 и 76, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71 и 77, и

b. LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82, 85 и 87, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83 и 18, LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84 и 86.

[805] 83. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 82, которые содержат VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

[806] 84. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 83, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 80 и 90 соответственно.

[807] 85. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ВТС, которые содержат VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

[808] 86. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-85, которые характеризуются форматом, выбранным из группы, состоящей из выделенного антитела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и scFv.

[809] 87. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту

осуществления 86, которые представляют собой Fab.

[810] 88. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 86, которые представляют собой scFv.

[811] 89. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 86, которые представляют собой выделенное антитело.

[812] 90. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 89, где выделенное антитело представляет собой моноклональное человеческое антитело.

[813] 91. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 89, где выделенное антитело представляет собой моноклональное гуманизированное антитело.

[814] 92. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-90, где Fab содержит Fc-область.

[815] 93. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 92, где Fc-область выбрана из группы, состоящей из Fc-области из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE и IgD.

[816] 94. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 92, где Fc-область содержит последовательность константной области каппа-цепи иммуноглобулина человека, представленную под SEQ ID NO: 159.

[817] 95. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 92, где Fc-область содержит первый константный Ig-домен тяжелой цепи иммуноглобулина человека (домен CH1), представленный под SEQ ID NO: 160.

[818] 96. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны конкурировать с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления 1-95 за связывание с ВТС и снижение ВТС-опосредованной передачи сигнала.

[819] 97. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 96, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, представленные под SEQ ID NO: 168 и 169 соответственно; SEQ ID NO: 170 и 171 соответственно; SEQ ID NO: 172 и 173 соответственно; SEQ ID NO: 174 и 175 соответственно; SEQ ID NO: 176 и 177 соответственно; SEQ ID NO: 178 и 179 соответственно; SEQ ID NO: 180 и 181 соответственно; SEQ ID NO: 182 и 183 соответственно; SEQ ID NO: 184 и 185 соответственно; SEQ ID NO: 186 и 187 соответственно или SEQ ID NO: 188 и 189 соответственно.

[820] 98. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-97.

[821] 99. Кассета экспрессии, содержащая полинуклеотид по варианту осуществления 98.

[822] 100. Вектор, содержащий кассету экспрессии по варианту осуществления 99.

[823] 101. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по варианту осуществления 98 или вектор по варианту осуществления 100.

[824] 102. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления 101 в условиях, подходящих для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[825] 103. Способ по варианту осуществления 102, который дополнительно включает проведение очистки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[826] 104. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-97.

[827] 105. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 104, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.

[828] 106. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-95 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 104 или 105.

[829] 107. Способ по варианту осуществления 106, где у субъекта имеется заболевание, выбранное из группы, состоящей из карциномы поджелудочной железы, рака молочной железы, аденокарциномы эндометрия, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и карциномы желудка.

[830] 108. Способ по варианту осуществления 107, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят путем, выбранным из группы, состоящей из внутривенного введения, внутримышечного введения, подкожного введения, парентерального введения, спинального введения и эпидермального введения.

[831] 109. Способ по варианту осуществления 106, где у субъекта имеется офтальмологическое нарушение.

[832] 110. Способ по варианту осуществления 109, где офтальмологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной глаукомы, диабетической ретинопатии, макулярного отека, патологической миопии, окклюзий вен сетчатки, ретинопатии недоношенных, аномальной пролиферации сосудов, ассоциированной с факоматозами, центральной серозной хориоретинопатии и острой мультифокальной плакоидной пигментной эпителиопатии.

[833] 111. Способ по варианту осуществления 110, где офтальмологическое нарушение представляет собой диабетический макулярный отек.

[834] 112. Способ по любому из вариантов осуществления 109-111, где введение осуществляют посредством субретинальной инъекции.

[835] 113. Способ по любому из вариантов осуществления 109-111, где введение

осуществляют посредством интравитреальной инъекции.

[836] 114. Способ по любому из вариантов осуществления 109-113, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит антагонист на основе антитела к VEGF.

[837] 115. Способ по варианту осуществления 114, где антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой ранибизумаб.

[838] 116. Способ по варианту осуществления 114, где антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой бевацизумаб.

[839] 117. Способ по варианту осуществления 114, где антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой афлиберцепт.

[840] 118. Способ по варианту осуществления 114, где антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой бролуцизумаб.

[841] 119. Способ по варианту осуществления 114, где антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой пэгаптаниб.

[842] 120. Способ по варианту осуществления 114, где антагонист на основе антитела к VEGF содержит тяжелую цепь и легкую цепь, представленные под SEQ ID NO: 103 и 114 соответственно.

[843] 121. Способ по варианту осуществления 120, где антагонист на основе антитела к VEGF кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 104 и 115.

[844] 122. Способ по любому из вариантов осуществления 109-113, дополнительно включающий введение субъекту антагониста на основе антитела к VEGF.

[845] 123. Способ по варианту осуществления 122, где антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой ранибизумаб.

[846] 124. Способ по варианту осуществления 122, где антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой бевацизумаб.

[847] 125. Способ по варианту осуществления 122, где антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой афлиберцепт.

[848] 126. Способ по варианту осуществления 122, где антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой бролуцизумаб.

[849] 127. Способ по варианту осуществления 122, где антагонист на основе антитела к VEGF представляет собой пэгаптаниб.

[850] 128. Способ по варианту осуществления 122, где антагонист на основе антитела к VEGF содержит тяжелую цепь и легкую цепь, представленные под SEQ ID NO: 103 и 114.

[851] 129. Способ по варианту осуществления 128, где антагонист на основе антитела к VEGF кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 104 и 115.

[852] 130. Набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-97 или фармацевтическую композицию по

варианту осуществления 104 или 105.

[853] 131. Набор по варианту осуществления 130, дополнительно содержащий инструкцию по применению.

[854] 132. Набор по варианту осуществления 131, дополнительно содержащий шприц.

[855] 133. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая 1) связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и 2) связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF.

[856] 134. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 133, где фрагмент, связывающий ВТС, связывается с ВТС, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

[857] 135. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 134, где фрагмент, связывающий ВТС, связывается с по меньшей мере одним остатком из SEQ ID NO: 157, выбранным из группы, состоящей из G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, R51, R53, F54, V56, A57, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76.

[858] 136. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 135, где фрагмент, связывающий ВТС, связывается с R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, Q59, T60, P61 и R73 из SEQ ID NO: 157.

[859] 137. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 135, где фрагмент, связывающий ВТС, связывается с P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, E58, Q59, T60, P61, A72, R73 E75 и R76 из SEQ ID NO: 157.

[860] 138. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 135, где фрагмент, связывающий ВТС, связывается с G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, R51, R53, F54 и V56 из SEQ ID NO: 157.

[861] 139. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 135, где фрагмент, связывающий ВТС, связывается с S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, A57, Q59, T60, P61, A72 R73 и E75 из SEQ ID NO: 157.

[862] 140. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 133, где фрагмент, связывающий ВТС, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-95.

[863] 141. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 133, где фрагмент, связывающий VEGF, представляет собой антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент.

[864] 142. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из вариантов осуществления 133-141, где фрагмент, связывающий ВТС, и фрагмент, связывающий VEGF, характеризуются форматом, выбранным из перечня, состоящего из выделенного антитела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и scFv.

[865] 143. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 142, где фрагмент, связывающий ВТС, представляет собой Fab к ВТС, и

фрагмент, связывающий VEGF, представляет собой Fab к VEGF.

[866] 144. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 143, где Fab к BTC содержит тяжелую цепь (HA) и легкую цепь (LA), и где Fab к VEGF содержит тяжелую цепь (HB) и легкую цепь (LB).

[867] 145. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 144, где HA и HB связаны в формате от N-конца к C-концу: N-HA-линкер-1-HB-C, и где LA и LB связаны в формате от N-конца к C-концу: N-LA-линкер-2-LB-C.

[868] 146. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 144, где HA и HB связаны в формате от N-конца к C-концу: N-HB-линкер-1-HA-C, и где LA и LB связаны в формате от N-конца к C-концу: N-LB-линкер-2-LA-C.

[869] 147. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 145 или 146, где линкер 1 и линкер 2 содержат последовательность аминокислот под SEQ ID NO: 118.

[870] 148. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 147, где линкер 1 и линкер 2 кодируются последовательностью нуклеотидов под SEQ ID NO: 119.

[871] 149. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 145 или 146, где линкер 1 и линкер 2 содержат последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 161-167.

[872] 150. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из вариантов осуществления 133-149, где фрагмент, связывающий BTC, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под:

- a. SEQ ID NO: 1, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно;
- b. SEQ ID NO: 4, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно;
- c. SEQ ID NO: 5, 6, 3, 17, 18 и 19 соответственно или
- d. SEQ ID NO: 7, 8, 9, 20, 18 и 16 соответственно.

[873] 151. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 150, где фрагмент, связывающий BTC, содержит VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно.

[874] 152. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 151, где VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 116 и 122 соответственно.

[875] 153. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из вариантов осуществления 133-148, где фрагмент, связывающий BTC, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под:

- a. SEQ ID NO: 25, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно;
- b. SEQ ID NO: 28, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно;
- c. SEQ ID NO: 29, 30, 27, 41, 42 и 43 соответственно или
- d. SEQ ID NO: 31, 32, 33, 44, 42 и 40 соответственно.

[876] 154. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту

осуществления 153, где фрагмент, связывающий BTC, содержит VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно.

[877] 155. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 153, где VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 127 и 132 соответственно.

[878] 156. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из вариантов осуществления 133-148, где фрагмент, связывающий BTC, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под:

- a. SEQ ID NO: 25, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно;
- b. SEQ ID NO: 28, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно;
- c. SEQ ID NO: 29, 51, 50, 61, 62 и 63 соответственно или
- d. SEQ ID NO: 31, 52, 53, 64, 62 и 60 соответственно.

[879] 157. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 156, где фрагмент, связывающий BTC, содержит VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно.

[880] 158. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 157, где VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 137 и 142 соответственно.

[881] 159. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из вариантов осуществления 133-148, где фрагмент, связывающий BTC, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под:

- a. SEQ ID NO: 69, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно;
- b. SEQ ID NO: 72, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно;
- c. SEQ ID NO: 73, 74, 71, 85, 18 и 86 соответственно или
- d. SEQ ID NO: 75, 76, 77, 87, 18 и 84 соответственно.

[882] 160. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 159, где фрагмент, связывающий BTC, содержит VH и VL с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

[883] 161. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 160, где VH и VL кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 147 и 151 соответственно.

[884] 162. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из вариантов осуществления 133-161, где фрагмент, связывающий VEGF, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 92, 93 и 94 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 105, 106 и 107 соответственно.

[885] 163. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из вариантов осуществления 133-161, где фрагмент, связывающий VEGF, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 95, 93 и 94 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 105, 106 и 107 соответственно.

[886] 164. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из вариантов

осуществления 133-161, где фрагмент, связывающий VEGF, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 96, 97 и 94 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 108, 109 и 110 соответственно.

[887] 165. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из вариантов осуществления 133-161, где фрагмент, связывающий VEGF, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 98, 99 и 100 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 111, 109 и 107 соответственно.

[888] 166. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из вариантов осуществления 133-165, где фрагмент, связывающий VEGF, содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[889] 167. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 166, где различия в аминокислотной последовательности находятся не в пределах определяющих комплементарность областей.

[890] 168. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 166, где различия в аминокислотной последовательности представляют собой консервативные замены.

[891] 169. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 166, где фрагмент, связывающий VEGF, содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[892] 170. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 169, где фрагмент, связывающий VEGF, содержит VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 102 и 113 соответственно.

[893] 171. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 169, где фрагмент, связывающий VEGF, содержит VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 117 и 123 соответственно.

[894] 172. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 169, где фрагмент, связывающий VEGF, содержит VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 128 и 133 соответственно.

[895] 173. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 169, где фрагмент, связывающий VEGF, содержит VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 138 и 143 соответственно.

[896] 174. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 169, где фрагмент, связывающий VEGF, содержит VH и VL, кодируемые

последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 148 и 152 соответственно.

[897] 175. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из вариантов осуществления 133-174, где фрагмент, связывающий VEGF, содержит тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 103 и 114 соответственно.

[898] 176. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 175, где тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 104 и 115 соответственно.

[899] 177. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая фрагмент, связывающий BTC, и фрагмент, связывающий VEGF, где фрагмент, связывающий BTC, содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VHA) и вариабельный домен легкой цепи (VLA), которые связываются с BTC, и где фрагмент, связывающий VEGF, содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VHB) и вариабельный домен легкой цепи (VLB), которые связываются с VEGF, где:

а. VHA и VLA содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно, и

б. VHB и VLB содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[900] 178. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 177, где фрагмент, связывающий BTC, дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1A) и константный домен легкой цепи (СКА), и где фрагмент, связывающий VEGF, дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1B) и константный домен легкой цепи (СКВ).

[901] 179. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 178, которая характеризуется форматом от N-конца к С-концу в виде: N-VHA-CH1A-линкер-VHB-CH1B-С и N-VLA-СКА-линкер-VLB-СКВ-С.

[902] 180. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 179, которая содержит тяжелую цепь, содержащую VHA, CH1A, линкер, VHB и CH1B, где тяжелая цепь представлена под SEQ ID NO: 120.

[903] 181. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 180, где тяжелая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 121.

[904] 182. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 179, которая содержит легкую цепь, содержащую VLA, СКА, линкер, VLB и СКВ, где легкая цепь представлена под SEQ ID NO: 125.

[905] 183. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 182, где легкая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 126.

[906] 184. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая фрагмент, связывающий BTC, и фрагмент, связывающий VEGF, где фрагмент, связывающий BTC, содержит переменный домен тяжелой цепи (VHA) и переменный домен легкой цепи (VLA), которые связываются с BTC, и где фрагмент, связывающий VEGF, содержит переменный домен тяжелой цепи (VHB) и переменный домен легкой цепи (VLB), которые связываются с VEGF, где:

а. VHA и VLA содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно, и

б. VHB и VLB содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[907] 185. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 184, где фрагмент, связывающий BTC, дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1A) и константный домен легкой цепи (СКА), и где фрагмент, связывающий VEGF, дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1B) и константный домен легкой цепи (СКВ).

[908] 186. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 185, которая характеризуется форматом от N-конца к C-концу в виде: N-VHA-CH1A-линкер-VHB-CH1B-C и N-VLA-СКА-линкер-VLB-СКВ-C.

[909] 187. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 186, которая содержит тяжелую цепь, содержащую VHA, CH1A, линкер, VHB и CH1B, где тяжелая цепь представлена под SEQ ID NO: 130.

[910] 188. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 187, где тяжелая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 131.

[911] 189. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 186, которая содержит легкую цепь, содержащую VLA, СКА, линкер, VLB и СКВ, где легкая цепь представлена под SEQ ID NO: 135.

[912] 190. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 189, где легкая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 136.

[913] 191. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая фрагмент, связывающий BTC, и фрагмент, связывающий VEGF, где фрагмент, связывающий BTC, содержит переменный домен тяжелой цепи (VHA) и переменный домен легкой цепи (VLA), которые связываются с BTC, и где фрагмент, связывающий VEGF, содержит переменный домен тяжелой цепи (VHB) и переменный домен легкой цепи (VLB), которые связываются с VEGF, где:

а. VHA и VLA содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно, и

б. VHB и VLB содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[914] 192. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 191, где фрагмент, связывающий BTC, дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1A) и константный домен легкой цепи (СКА), и где фрагмент, связывающий VEGF, дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1B) и константный домен легкой цепи (СКВ).

[915] 193. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 192, которая характеризуется форматом от N-конца к С-концу в виде: N-VHA-CH1A-линкер-VHB-CH1B-С и N-VLA-СКА-линкер-VLB-СКВ-С.

[916] 194. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 193, которая содержит тяжелую цепь, содержащую VHA, CH1A, линкер, VHB и CH1B, где тяжелая цепь представлена под SEQ ID NO: 140.

[917] 195. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 194, где тяжелая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 141.

[918] 196. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 193, которая содержит легкую цепь, содержащую VLA, СКА, линкер, VLB и СКВ, где легкая цепь представлена под SEQ ID NO: 145.

[919] 197. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 196, где легкая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 146.

[920] 198. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая фрагмент, связывающий BTC, и фрагмент, связывающий VEGF, где фрагмент, связывающий BTC, содержит переменный домен тяжелой цепи (VHA) и переменный домен легкой цепи (VLA), которые связываются с BTC, и где фрагмент, связывающий VEGF, содержит переменный домен тяжелой цепи (VHB) и переменный домен легкой цепи (VLB), которые связываются с VEGF, где:

а. VHA и VLA содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно, и

б. VHB и VLB содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[921] 199. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 198, где фрагмент, связывающий BTC, дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1A) и константный домен легкой цепи (СКА), и где фрагмент, связывающий VEGF, дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи (CH1B) и константный домен легкой цепи (СКВ).

[922] 200. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 199, которая характеризуется форматом от N-конца к С-концу в виде: N-VHA-CH1A-линкер-VHB-CH1B-С и N-VLA-СКА-линкер-VLB-СКВ-С.

[923] 201. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 200, которая содержит тяжелую цепь, содержащую VHA, CH1A, линкер,

VNB и CH1B, где тяжелая цепь представлена под SEQ ID NO: 149.

[924] 202. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 201, где тяжелая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 150.

[925] 203. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 200, которая содержит легкую цепь, содержащую VLA, СКА, линкер, VLB и СКВ, где легкая цепь представлена под SEQ ID NO: 154.

[926] 204. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 203, где легкая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 155.

[927] 205. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 120, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 125.

[928] 206. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 205, где первая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 121, и вторая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 126.

[929] 207. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 130, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 135.

[930] 208. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 207, где первая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 131, и вторая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 136.

[931] 209. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 140, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145.

[932] 210. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 209, где первая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 141, и вторая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 146.

[933] 211. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 149, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 154.

[934] 212. Мультиспецифическая связывающая молекула по варианту осуществления 211, где первая полипептидная цепь кодируется последовательностью

нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 150, и вторая полипептидная цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 155.

[935] 213. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие мультиспецифическую связывающую молекулу по любому из вариантов осуществления 133-212.

[936] 214. Кассета экспрессии, содержащая полинуклеотид по варианту осуществления 213.

[937] 215. Вектор, содержащий кассету экспрессии по варианту осуществления 214.

[938] 216. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по варианту осуществления 213 или вектор по варианту осуществления 215.

[939] 217. Способ получения мультиспецифической связывающей молекулы, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления 216 в условиях, подходящих для экспрессии мультиспецифической связывающей молекулы или ее фрагмента.

[940] 218. Способ по варианту осуществления 217, который дополнительно включает проведение очистки мультиспецифической связывающей молекулы.

[941] 219. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество мультиспецифической связывающей молекулы по любому из вариантов осуществления 133-212.

[942] 220. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 219, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.

[943] 221. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 220, дополнительно содержащая одно или несколько терапевтических средств.

[944] 222. Способ лечения офтальмологического нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы по любому из вариантов осуществления 133-212 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 219 или 220.

[945] 223. Способ по варианту осуществления 222, где мультиспецифическую связывающую молекулу или фармацевтическую композицию вводят субъекту интравитреально.

[946] 224. Способ по варианту осуществления 222, где мультиспецифическую связывающую молекулу или фармацевтическую композицию вводят посредством субретинальной инъекции.

[947] 225. Способ по любому из вариантов осуществления 222-224, где офтальмологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной глаукомы, диабетической ретинопатии, макулярного отека, патологической миопии, окклюзий вен сетчатки, ретинопатии недоношенных и аномальной пролиферации сосудов, ассоциированной с факоматозами.

[948] 226. Способ по варианту осуществления 222, где офтальмологическое нарушение представляет собой диабетический макулярный отек.

[949] 227. Способ, включающий введение субъекту эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы по любому из вариантов осуществления 133-212, где мультиспецифическая связывающая молекула снижает утечку жидкости из сетчатки и/или утолщение сетчатки у субъекта относительно контрольного субъекта.

[950] 228. Набор, содержащий мультиспецифическую связывающую молекулу по любому из вариантов осуществления 133-204 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 219 или 220.

[951] 229. Набор по варианту осуществления 228, дополнительно содержащий инструкцию по применению.

[952] 230. Набор по варианту осуществления 229, дополнительно содержащий шприц.

[953] 231. Способ предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, неоваскулярной AMD или RVO у субъекта, нуждающегося в этом, включающий интравитреальное введение субъекту мультиспецифической связывающей молекулы по любому из вариантов осуществления 133-212 при дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,25 мг/глаз до 7,5 мг/глаз.

[954] 232. Способ по варианту осуществления 231, где доза составляет приблизительно 0,25 мг/глаз, 0,75 мг/глаз, 2,5 мг/глаз или 7,5 мг/глаз.

[955] 233. Способ по варианту осуществления 231, где доза составляет 0,25 мг/глаз.

[956] 234. Способ по варианту осуществления 231, где доза составляет 0,75 мг/глаз.

[957] 235. Способ по варианту осуществления 231, где доза составляет 1 мг/глаз.

[958] 236. Способ по варианту осуществления 231, где доза составляет 2,5 мг/глаз.

[959] 237. Способ по варианту осуществления 231, где доза составляет 3 мг/глаз.

[960] 238. Способ по варианту осуществления 231, где доза составляет 5 мг/глаз.

[961] 239. Способ по варианту осуществления 231, где доза составляет 7,5 мг/глаз.

[962] 240. Способ по варианту осуществления 231, где доза составляет 0,25 мг/глаз, 0,3 мг/глаз, 0,35 мг/глаз, 0,4 мг/глаз, 0,45 мг/глаз, 0,5 мг/глаз, 0,55 мг/глаз, 0,6 мг/глаз, 0,65 мг/глаз, 0,7 мг/глаз, 0,75 мг/глаз, 0,8 мг/глаз, 0,85 мг/глаз, 0,9 мг/глаз, 0,95 мг/глаз, 1,0 мг/глаз, 1,1 мг/глаз, 1,2 мг/глаз, 1,3 мг/глаз, 1,4 мг/глаз, 1,5 мг/глаз, 1,6 мг/глаз, 1,7 мг/глаз, 1,8 мг/глаз, 1,9 мг/глаз, 2,0 мг/глаз, 2,1 мг/глаз, 2,2 мг/глаз, 2,3 мг/глаз, 2,4 мг/глаз, 2,5 мг/глаз, 2,6 мг/глаз, 2,7 мг/глаз, 2,8 мг/глаз, 2,9 мг/глаз, 3,0 мг/глаз, 3,1 мг/глаз, 3,2 мг/глаз, 3,3 мг/глаз, 3,4 мг/глаз, 3,5 мг/глаз, 3,6 мг/глаз, 3,7 мг/глаз, 3,8 мг/глаз, 3,9 мг/глаз, 4,0 мг/глаз, 4,1 мг/глаз, 4,2 мг/глаз, 4,3 мг/глаз, 4,4 мг/глаз, 4,5 мг/глаз, 4,6 мг/глаз, 4,7 мг/глаз, 4,8 мг/глаз, 4,9 мг/глаз, 5,0 мг/глаз, 5,1 мг/глаз, 5,2 мг/глаз, 5,3 мг/глаз, 5,4 мг/глаз, 5,5 мг/глаз, 5,6 мг/глаз, 5,7 мг/глаз, 5,8 мг/глаз, 5,9 мг/глаз, 6,0 мг/глаз, 6,1 мг/глаз, 6,2 мг/глаз, 6,3 мг/глаз, 6,4 мг/глаз, 6,5 мг/глаз, 6,6 мг/глаз, 6,7 мг/глаз, 6,8 мг/глаз, 6,9 мг/глаз, 7,0 мг/глаз, 7,1 мг/глаз, 7,2 мг/глаз, 7,3 мг/глаз, 7,4 мг/глаз или 7,5 мг/глаз.

[963] 241. Способ по любому из вариантов осуществления 231-240, где

мультиспецифическая связывающая молекула содержит 1) фрагмент, связывающий ВТС, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно, и 2) связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

[964] 242. Способ по любому из вариантов осуществления 231-241, где введение осуществляют один раз в месяц.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с бетацеллюлином (BTC), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент характеризуются константой диссоциации (KD), составляющей 5 пМ или меньше.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, которые связываются с по меньшей мере одним остатком из SEQ ID NO: 157, выбранным из группы, состоящей из G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, R51, R53, F54, V56, A57, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76;

связываются с R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, Q59, T60, P61 и R73 из SEQ ID NO: 157;

связываются с P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, E58, Q59, T60, P61, A72, R73, E75 и R76 из SEQ ID NO: 157;

связываются с G34, H35, F36, S37, R38, C39, P40, K41, Q42, R51, R53, F54 и V56 из SEQ ID NO: 157 или

S37, R38, C39, P40, K41, Q42, Y43, H45, Y46, F54, A57, Q59, T60, P61, A72, R73 и E75 из SEQ ID NO: 157.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, которые содержат определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (HCDR1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (HCDR2) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (HCDR3), и определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи, (LCDR1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (LCDR2) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (LCDR3), где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены под:

SEQ ID NO: 1, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно; SEQ ID NO: 4, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно; SEQ ID NO: 5, 6, 3, 17, 18 и 19 соответственно; SEQ ID NO: 7, 8, 9, 20, 18 и 16 соответственно;

SEQ ID NO: 25, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно; SEQ ID NO: 28, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно; SEQ ID NO: 29, 30, 27, 41, 42 и 43 соответственно или SEQ ID NO: 31, 32, 33, 44, 42 и 40 соответственно;

SEQ ID NO: 25, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно; SEQ ID NO: 28, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно; SEQ ID NO: 29, 51, 50, 61, 62 и 63 соответственно или SEQ ID NO: 31, 52, 53, 64, 62 и 60 соответственно, или

SEQ ID NO: 69, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно; SEQ ID NO: 72, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно; SEQ ID NO: 73, 74, 71, 85, 18 и 86 соответственно или SEQ ID NO: 75, 76, 77, 87, 18 и 84 соответственно.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, которые содержат варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой цепи

(VL), содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с:

SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно;

SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно;

SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно или

SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под:

SEQ ID NO: 12 и 23 соответственно;

SEQ ID NO: 36 и 47 соответственно;

SEQ ID NO: 56 и 67 соответственно или

SEQ ID NO: 80 и 90 соответственно.

6. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5.

7. Кассета или вектор экспрессии, содержащие полинуклеотид по п. 6.

8. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 6 или кассету или вектор экспрессии по п. 7.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-8.

10. Способ лечения нуждающегося в этом субъекта, имеющего офтальмологическое нарушение, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-7 или фармацевтической композиции по п. 9, где офтальмологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной глаукомы, диабетической ретинопатии, макулярного отека, патологической миопии, окклюзий вен сетчатки, ретинопатии недоношенных, аномальной пролиферации сосудов, ассоциированной с факоматозами, центральной серозной хориоретинопатии и острой мультифокальной плакоидной пигментной эпителиопатии.

11. Способ по п. 10, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит антагонист на основе антитела к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), или при этом способ дополнительно включает введение субъекту антагониста на основе антитела к VEGF, при этом антагонист на основе антитела к VEGF выбран из группы, состоящей из ранибизумаба, бевацизумаба, афлиберцепта, бролуцизумаба и пэгэптаниба, или при этом антагонист на основе антитела к VEGF содержит тяжелую цепь и легкую цепь, представленные под SEQ ID NO: 103 и 114 соответственно.

12. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая 1) связывающую функциональную единицу на основе антитела к ВТС и 2) связывающую функциональную единицу на основе антитела к VEGF.

13. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 12, где связывающая

функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент в формате, выбранном из группы, состоящей из выделенного антитела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и scFv.

14. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 13, где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC представляет собой Fab к BTC, и связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF представляет собой Fab к VEGF, при этом Fab к BTC содержит тяжелую цепь (HA) и легкую цепь (LA), и при этом Fab к VEGF содержит тяжелую цепь (HB) и легкую цепь (LB).

15. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 14, где HA и HB соединены в формате от N-конца к C-концу: N-HA-линкер-1-HB-C, и где LA и LB связаны в формате от N-конца к C-концу: N-LA-линкер-2-LB-C.

16. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 12-15, где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под:

SEQ ID NO: 1, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно; SEQ ID NO: 4, 2, 3, 14, 15 и 16 соответственно; SEQ ID NO: 5, 6, 3, 17, 18 и 19 соответственно; SEQ ID NO: 7, 8, 9, 20, 18 и 16 соответственно;

SEQ ID NO: 25, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно; SEQ ID NO: 28, 26, 27, 38, 39 и 40 соответственно; SEQ ID NO: 29, 30, 27, 41, 42 и 43 соответственно или SEQ ID NO: 31, 32, 33, 44, 42 и 40 соответственно;

SEQ ID NO: 25, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно; SEQ ID NO: 28, 49, 50, 58, 59 и 60 соответственно; SEQ ID NO: 29, 51, 50, 61, 62 и 63 соответственно или SEQ ID NO: 31, 52, 53, 64, 62 и 60 соответственно, или

SEQ ID NO: 69, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно; SEQ ID NO: 72, 70, 71, 82, 83 и 84 соответственно; SEQ ID NO: 73, 74, 71, 85, 18 и 86 соответственно или SEQ ID NO: 75, 76, 77, 87, 18 и 84 соответственно.

17. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 12-16, где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с:

SEQ ID NO: 10 и 21 соответственно;

SEQ ID NO: 34 и 45 соответственно;

SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно или

SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно.

18. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 12-17, где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под:

SEQ ID NO: 12 и 23 соответственно;

SEQ ID NO: 36 и 47 соответственно;

SEQ ID NO: 56 и 67 соответственно или

SEQ ID NO: 80 и 90 соответственно.

19. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 12-18, где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под:

SEQ ID NO: 92, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно;

SEQ ID NO: 95, 93, 94, 105, 106 и 107 соответственно;

SEQ ID NO: 96, 97, 94, 108, 109 и 110 соответственно или

SEQ ID NO: 98, 99, 100, 111, 109 и 107 соответственно.

20. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 12-19, где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит VH и VL, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 101 и 112 соответственно.

21. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 12-20, где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной под:

SEQ ID NO: 102 и 113 соответственно;

SEQ ID NO: 117 и 123 соответственно;

SEQ ID NO: 128 и 133 соответственно;

SEQ ID NO: 138 и 143 соответственно или

SEQ ID NO: 148 и 152 соответственно.

22. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 12-21, где связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 103 и 114 соответственно, или при этом тяжелая цепь и легкая цепь кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 104 и 115 соответственно.

23. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 12-22, где связывающая функциональная единица на основе антитела к BTC содержит переменный домен тяжелой цепи (VHA) и переменный домен легкой цепи (VLA), которые связываются с BTC, и при этом связывающая функциональная единица на основе антитела к VEGF содержит переменный домен тяжелой цепи (VHB) и переменный домен легкой цепи (VLB), которые связываются с VEGF, при этом мультиспецифическая связывающая молекула представлена в формате от N-конца до C-конца следующим образом: N-VHA-CH1A-линкер-VHB-CH1B-C и N-VLA-СКА-линкер-VLB-СКВ-C, который предусматривает тяжелую цепь, содержащую VHA, CH1A, линкер, VHB и CH1B, и который предусматривает легкую цепь, содержащую VLA, СКА, линкер, VLB и СКВ, где тяжелая цепь и легкая цепь представлены под:

SEQ ID NO: 120 и 125 соответственно;

SEQ ID NO: 130 и 135 соответственно;

SEQ ID NO: 140 и 145 соответственно или

SEQ ID NO: 149 и 154 соответственно.

24. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие мультиспецифическую связывающую молекулу по любому из пп. 12-23.

25. Кассета или вектор экспрессии, содержащие полинуклеотид по п. 24.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пп. 12-23.

27. Способ лечения офтальмологического нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пп. 12-23 или фармацевтической композиции по п. 26, где офтальмологическое нарушение выбрано из группы, состоящей из диабетического макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной глаукомы, диабетической ретинопатии, макулярного отека, патологической миопии, окклюзий вен сетчатки, ретинопатии недоношенных и аномальной пролиферации сосудов, ассоциированной с факоматозами.

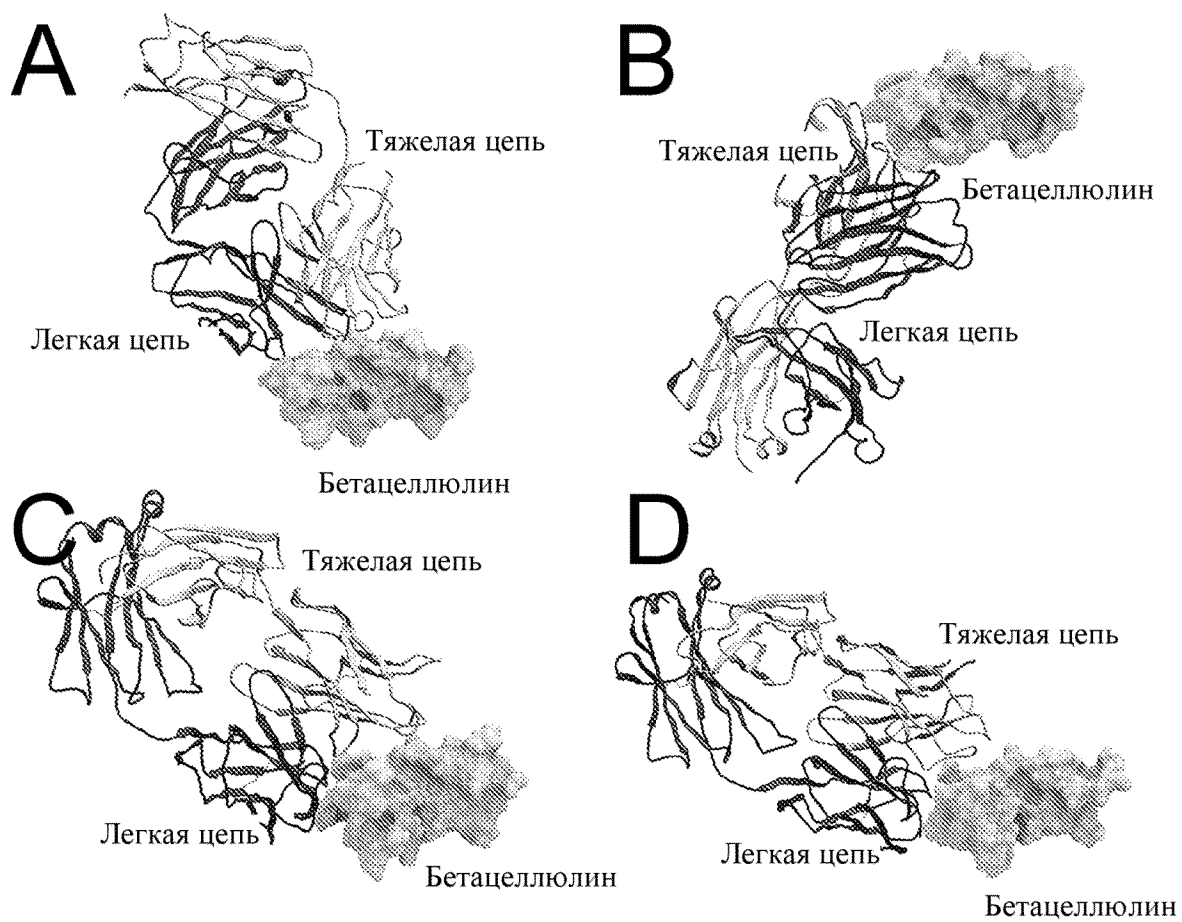
28. Набор, содержащий мультиспецифическую связывающую молекулу по любому из пп. 12-23 или фармацевтическую композицию по п. 26.

29. Способ предупреждения или лечения макулярного отека, DME, AMD, неоваскулярной AMD или RVO у субъекта, нуждающегося в этом, включающий интравитреальное введение субъекту мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пп. 12-23 в дозе, составляющей приблизительно 0,25 мг/глаз, 0,75 мг/глаз, 2,5 мг/глаз или 7,5 мг/глаз.

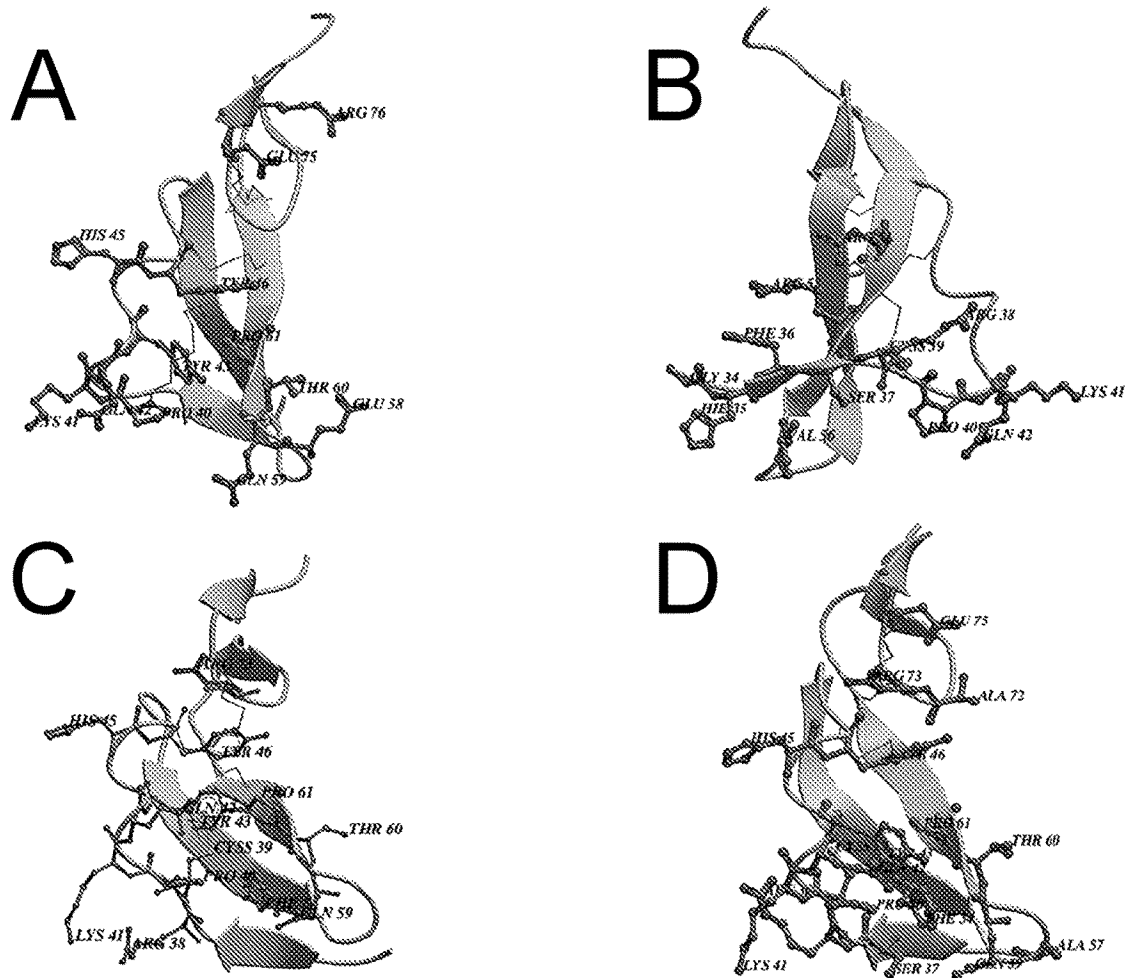
30. Способ по п. 29, где доза составляет 0,25 мг/глаз, 0,3 мг/глаз, 0,35 мг/глаз, 0,4 мг/глаз, 0,45 мг/глаз, 0,5 мг/глаз, 0,55 мг/глаз, 0,6 мг/глаз, 0,65 мг/глаз, 0,7 мг/глаз, 0,75 мг/глаз, 0,8 мг/глаз, 0,85 мг/глаз, 0,9 мг/глаз, 0,95 мг/глаз, 1,0 мг/глаз, 1,1 мг/глаз, 1,2 мг/глаз, 1,3 мг/глаз, 1,4 мг/глаз, 1,5 мг/глаз, 1,6 мг/глаз, 1,7 мг/глаз, 1,8 мг/глаз, 1,9 мг/глаз, 2,0 мг/глаз, 2,1 мг/глаз, 2,2 мг/глаз, 2,3 мг/глаз, 2,4 мг/глаз, 2,5 мг/глаз, 2,6 мг/глаз, 2,7 мг/глаз, 2,8 мг/глаз, 2,9 мг/глаз, 3,0 мг/глаз, 3,1 мг/глаз, 3,2 мг/глаз, 3,3 мг/глаз, 3,4 мг/глаз, 3,5 мг/глаз, 3,6 мг/глаз, 3,7 мг/глаз, 3,8 мг/глаз, 3,9 мг/глаз, 4,0 мг/глаз, 4,1 мг/глаз, 4,2 мг/глаз, 4,3 мг/глаз, 4,4 мг/глаз, 4,5 мг/глаз, 4,6 мг/глаз, 4,7 мг/глаз, 4,8 мг/глаз, 4,9 мг/глаз, 5,0 мг/глаз, 5,1 мг/глаз, 5,2 мг/глаз, 5,3 мг/глаз, 5,4 мг/глаз, 5,5 мг/глаз, 5,6 мг/глаз, 5,7 мг/глаз, 5,8 мг/глаз, 5,9 мг/глаз, 6,0 мг/глаз, 6,1 мг/глаз, 6,2 мг/глаз, 6,3 мг/глаз, 6,4 мг/глаз, 6,5 мг/глаз, 6,6 мг/глаз, 6,7 мг/глаз, 6,8 мг/глаз, 6,9 мг/глаз, 7,0 мг/глаз, 7,1 мг/глаз, 7,2 мг/глаз, 7,3 мг/глаз, 7,4 мг/глаз или 7,5 мг/глаз.

По доверенности

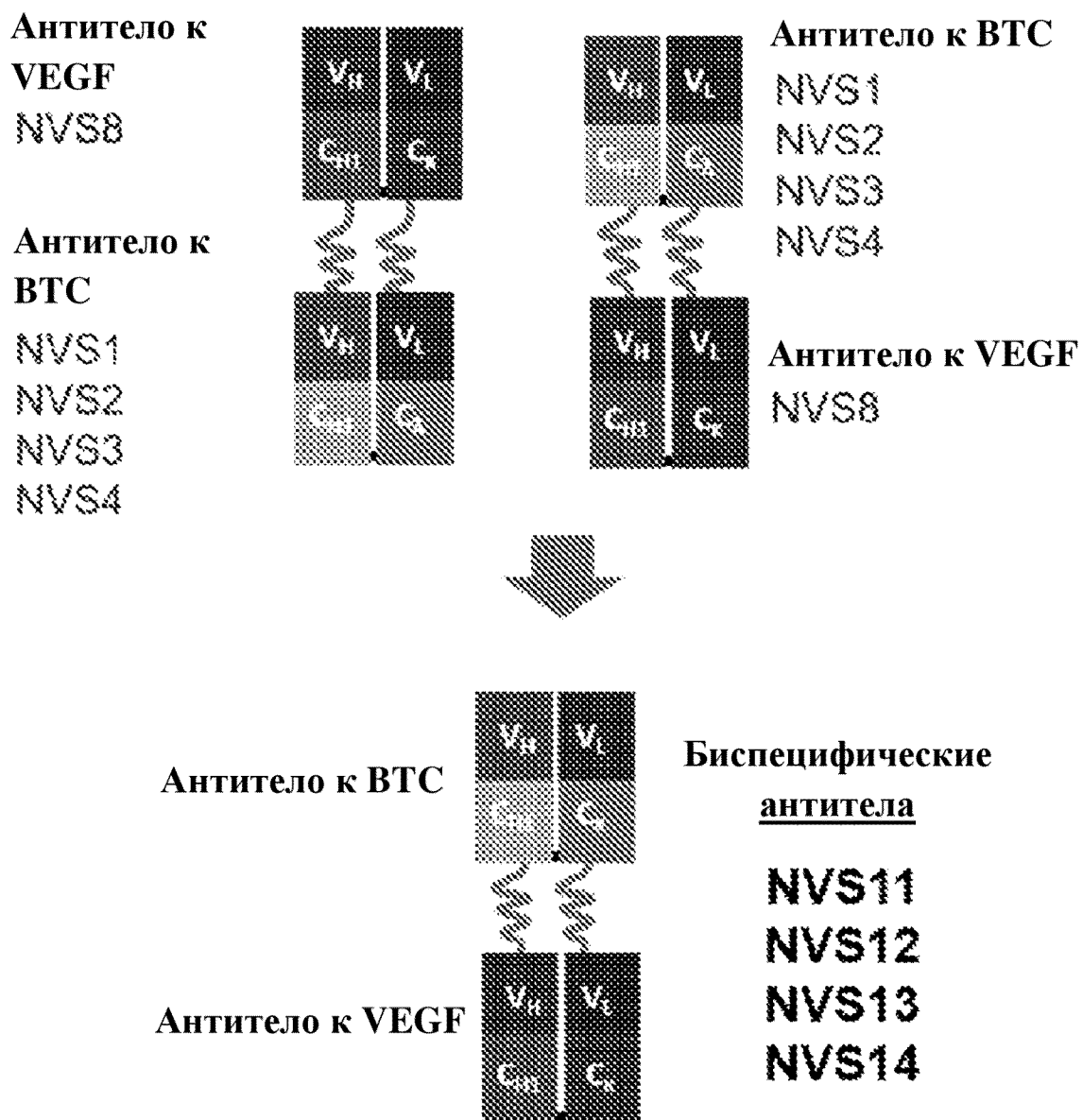
Фиг. 1



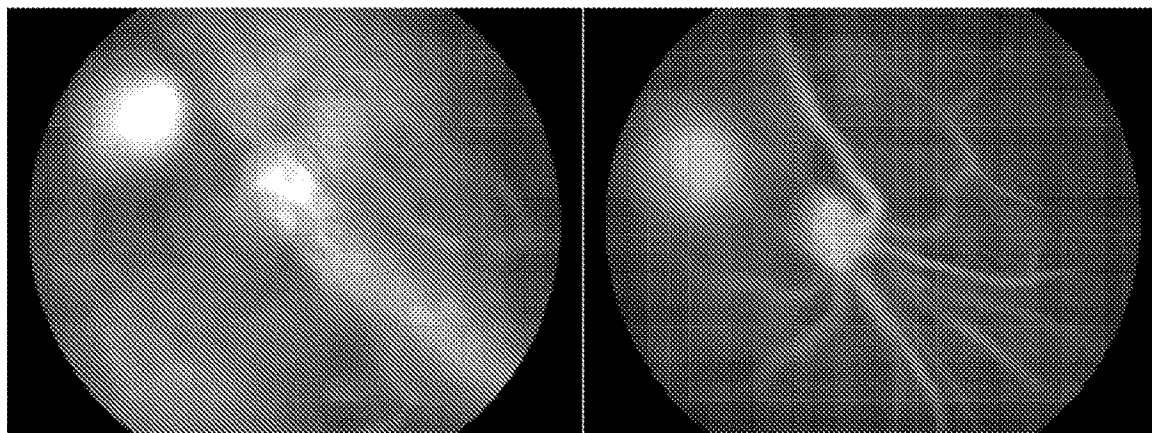
Фиг. 2



Фиг. 3



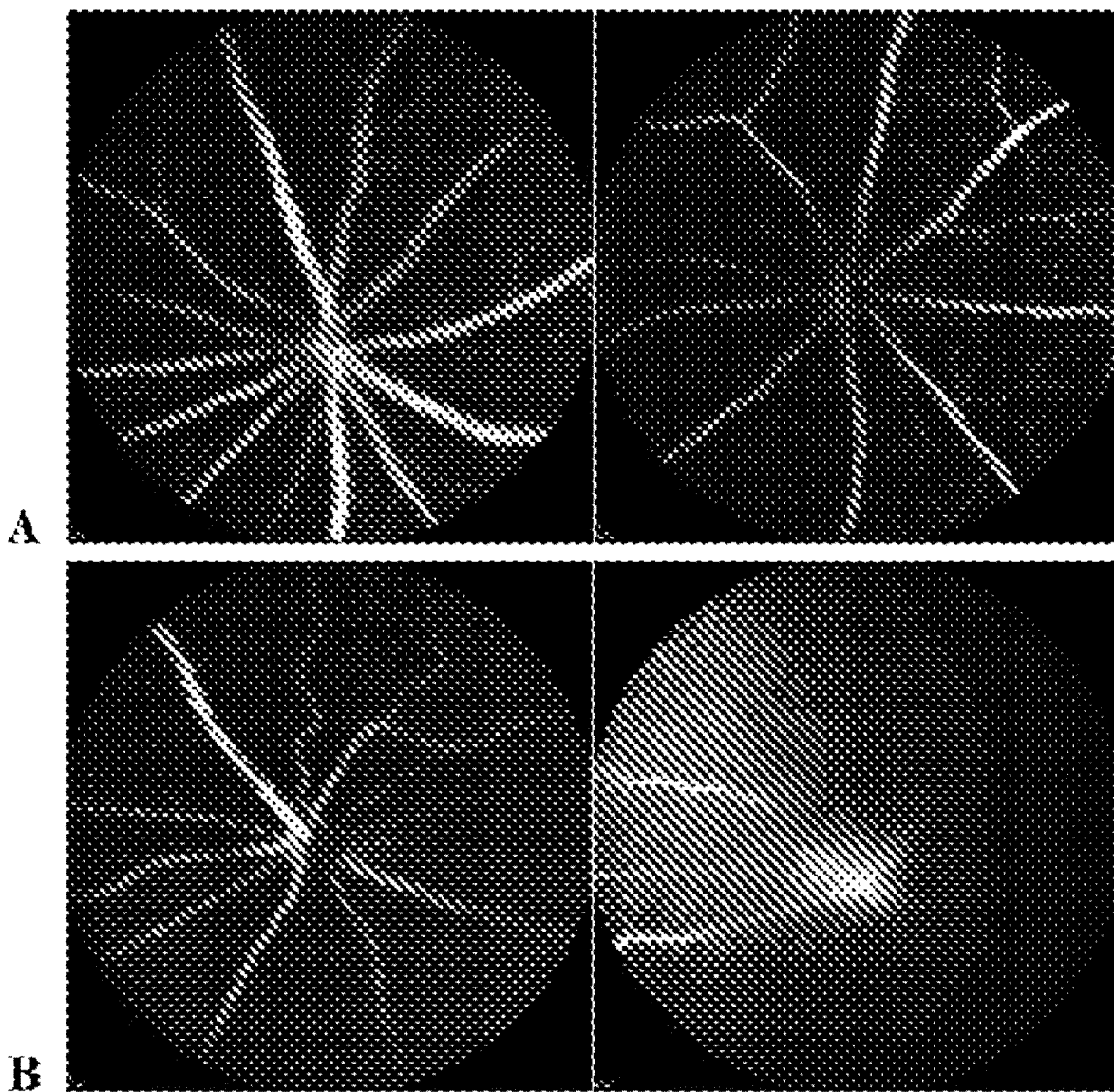
Фиг. 4



Съемка глазного дна: мышь
0104193-3-OD, которой инъецировали
scAAV2-CMV-BTC

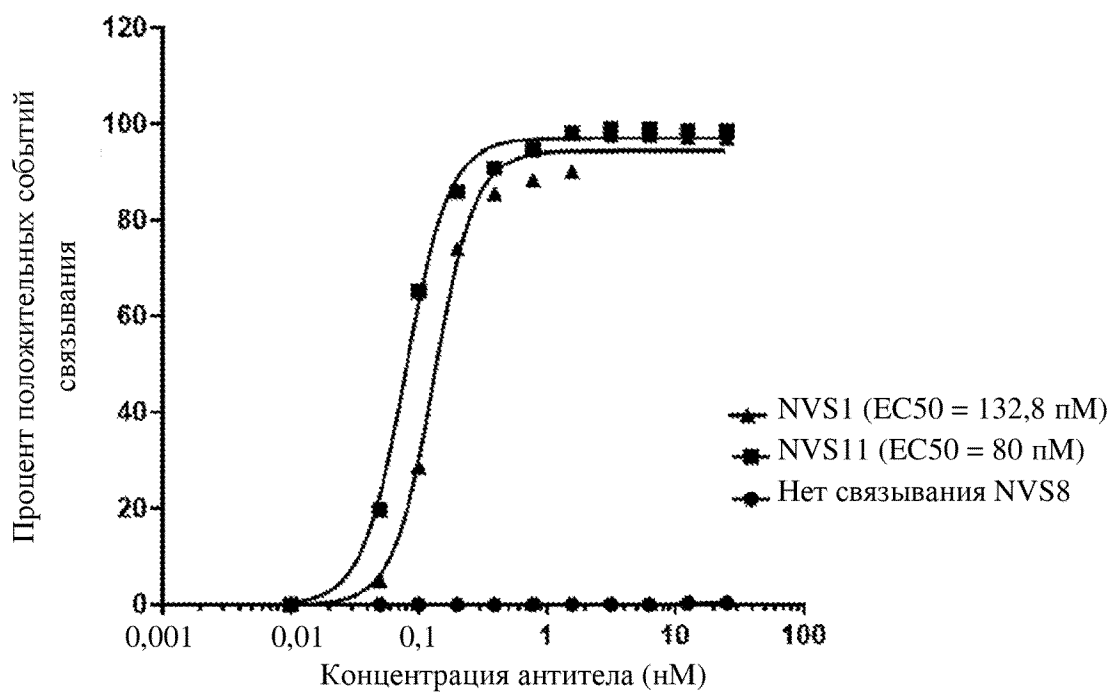
Флуоресцентная ангиография глазного
дна: мышь 0104193-3-OD, которой
инъецировали scAAV2-CMV-BTC

Фиг. 5

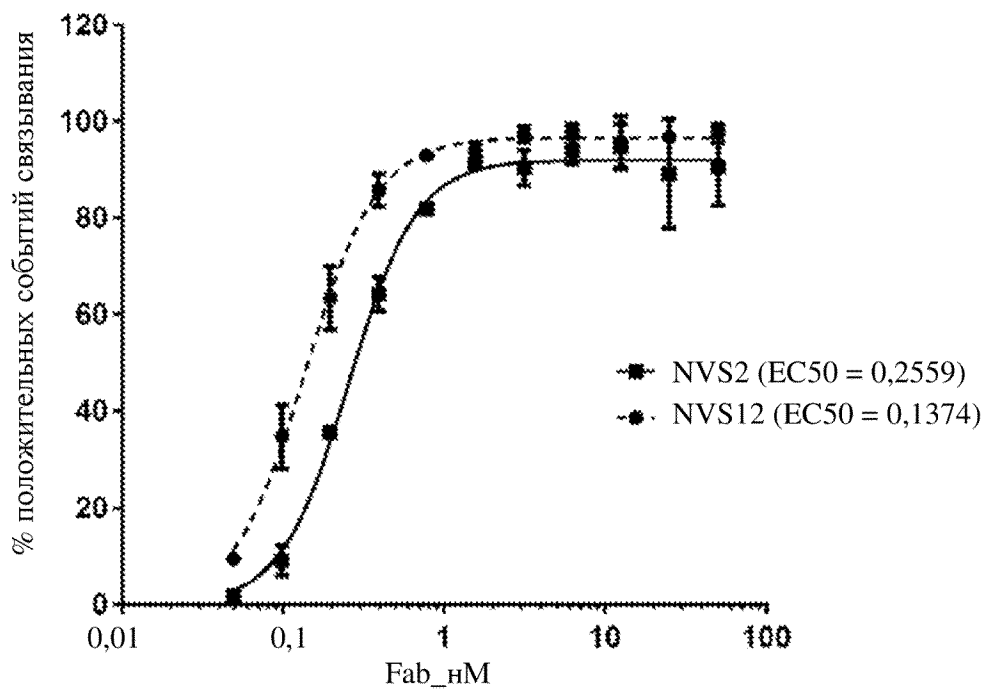


Фиг. 6

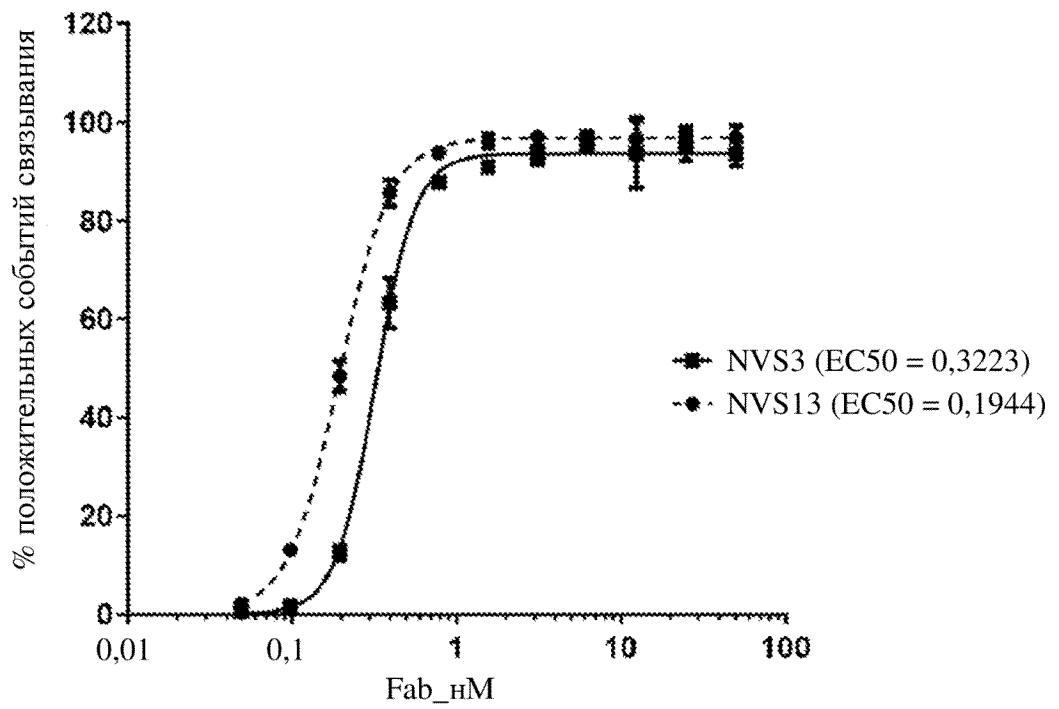
А.



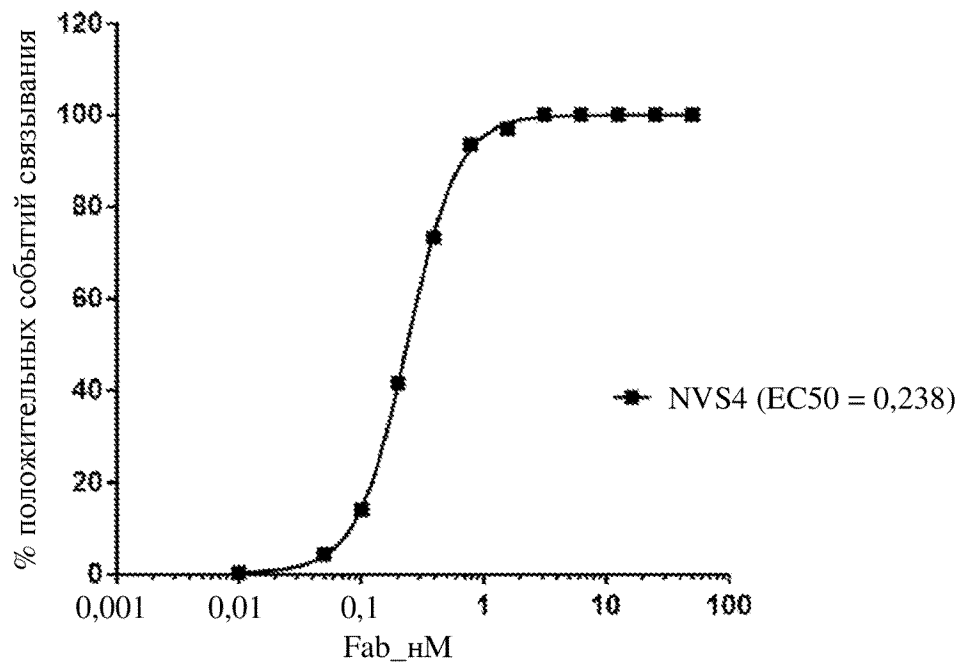
В.



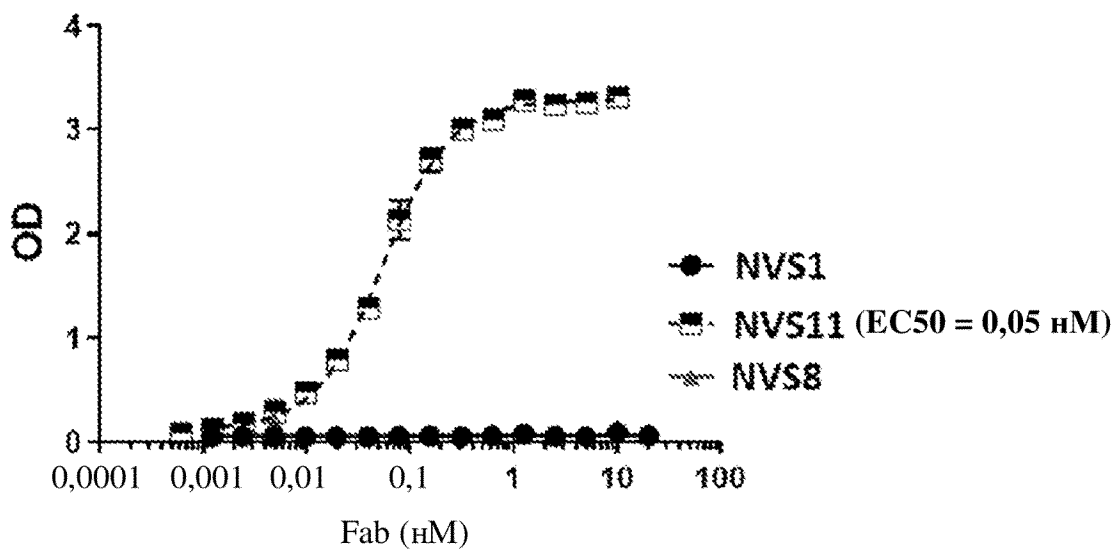
C.



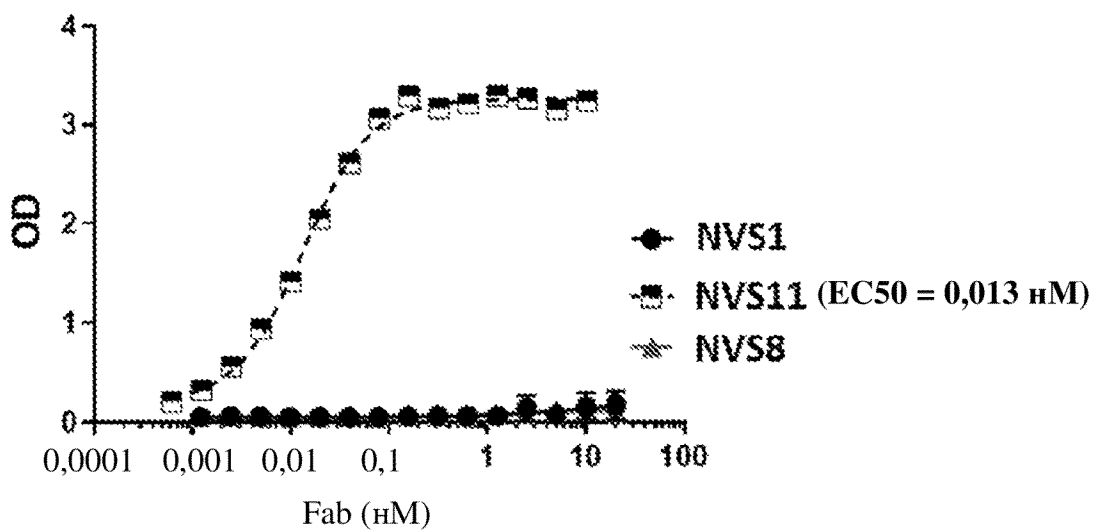
D.

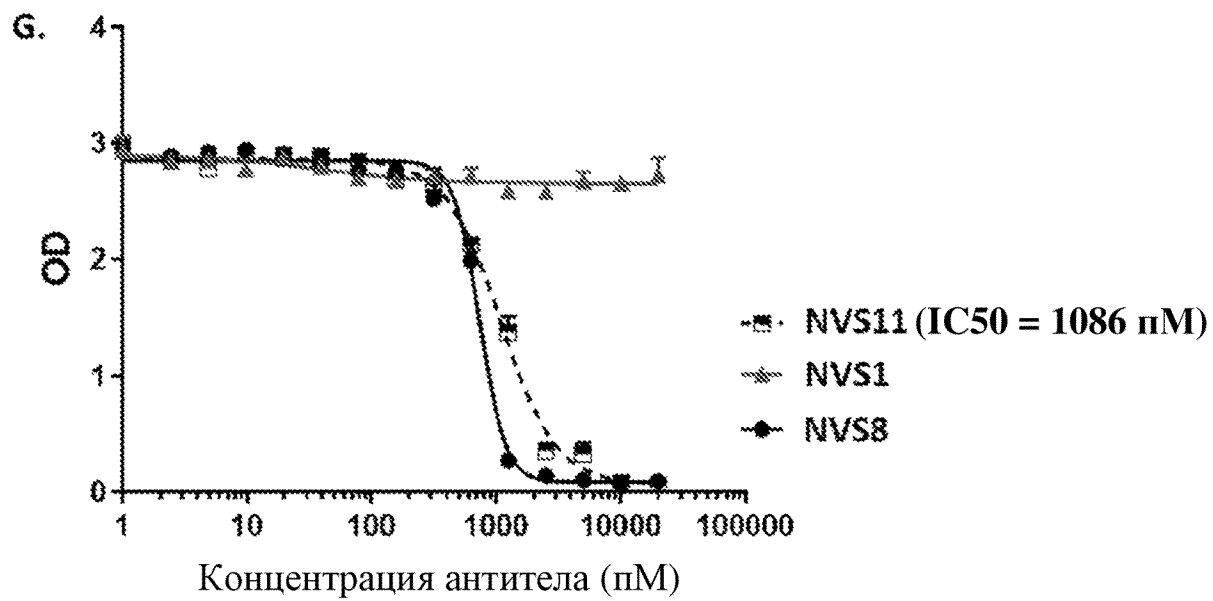


E BTC покрытия и обнаружение VEGF-биотина



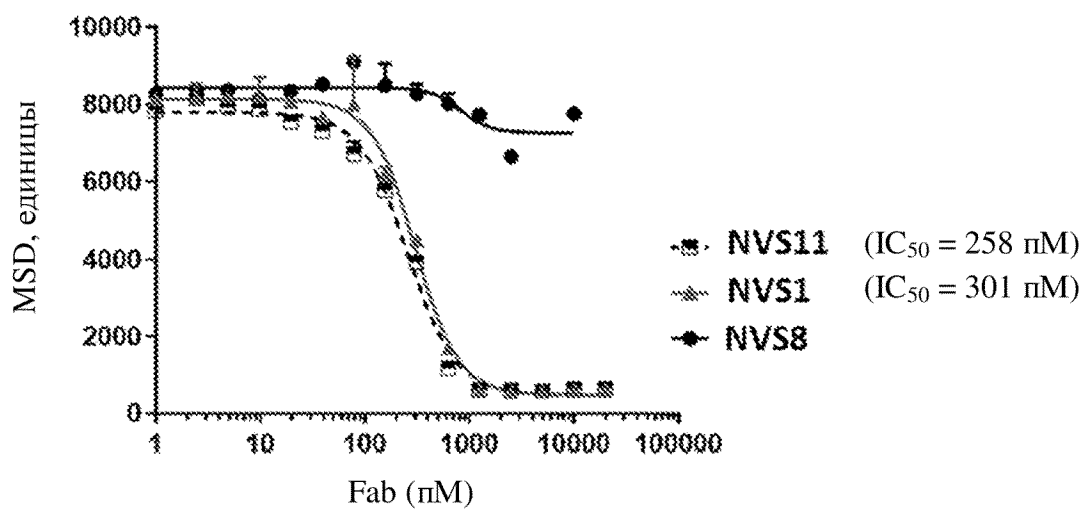
F VEGF покрытия и обнаружение VEGF-биотина



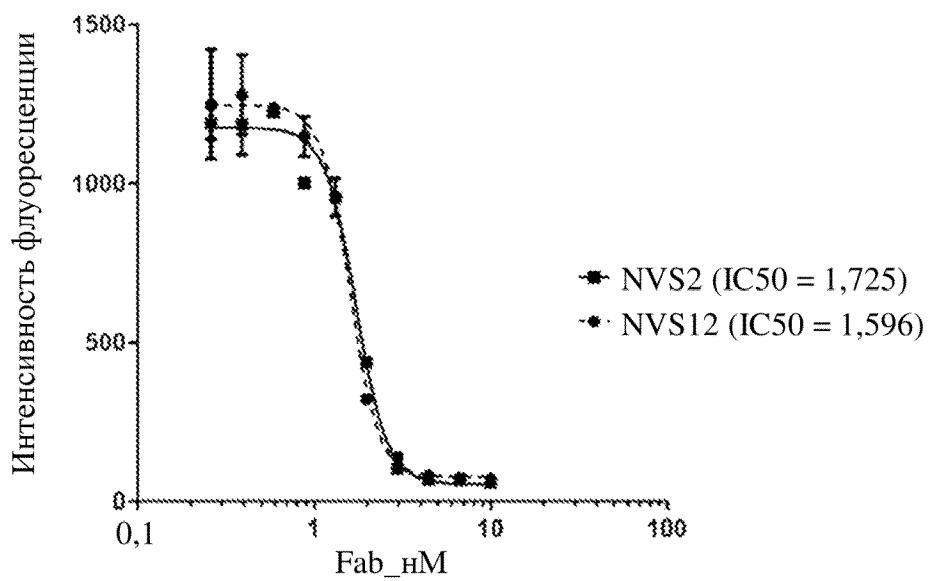


Фиг. 7

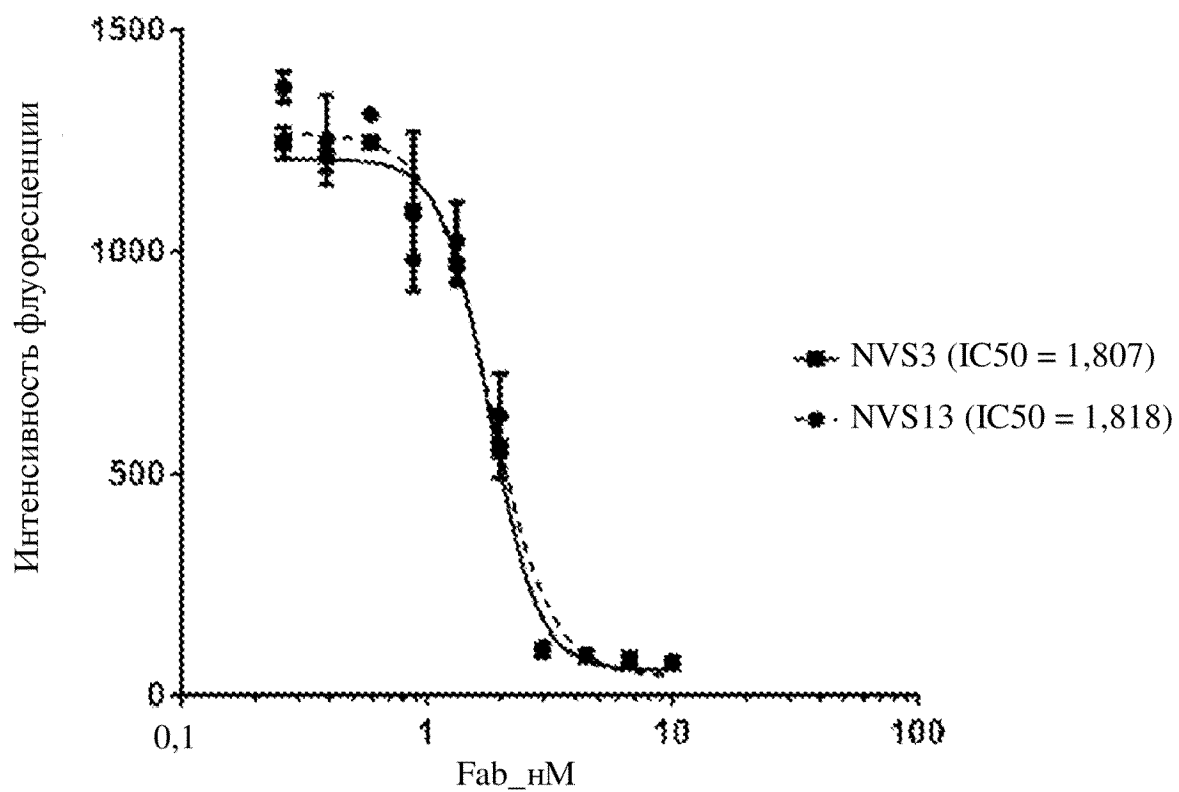
А.



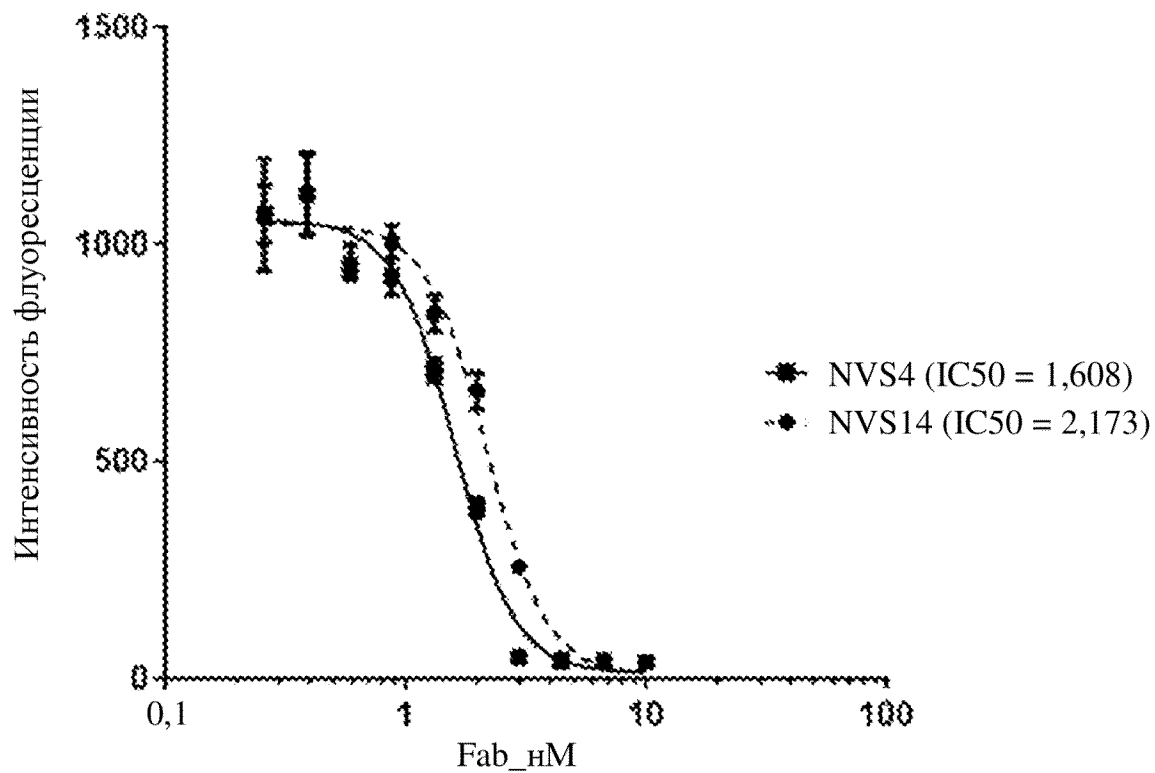
В.



C.

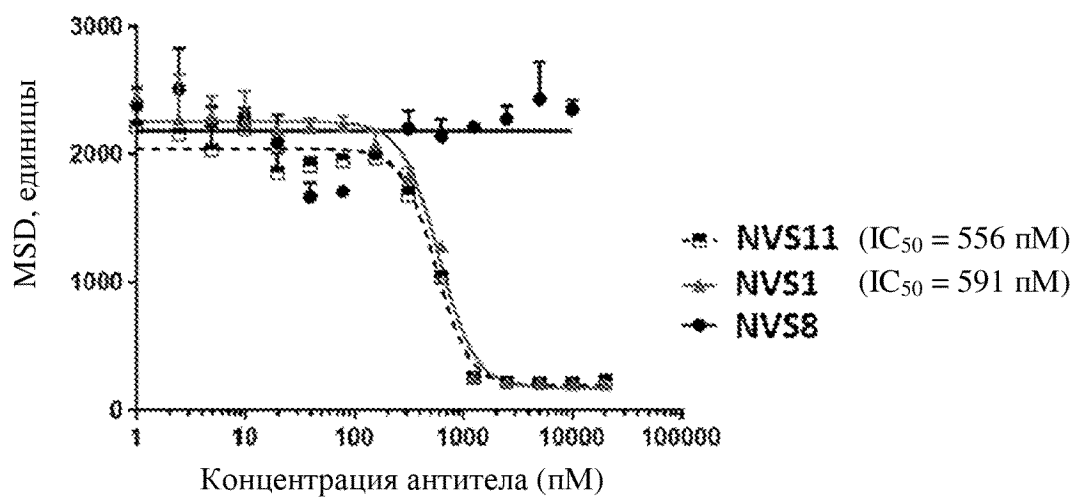


D.

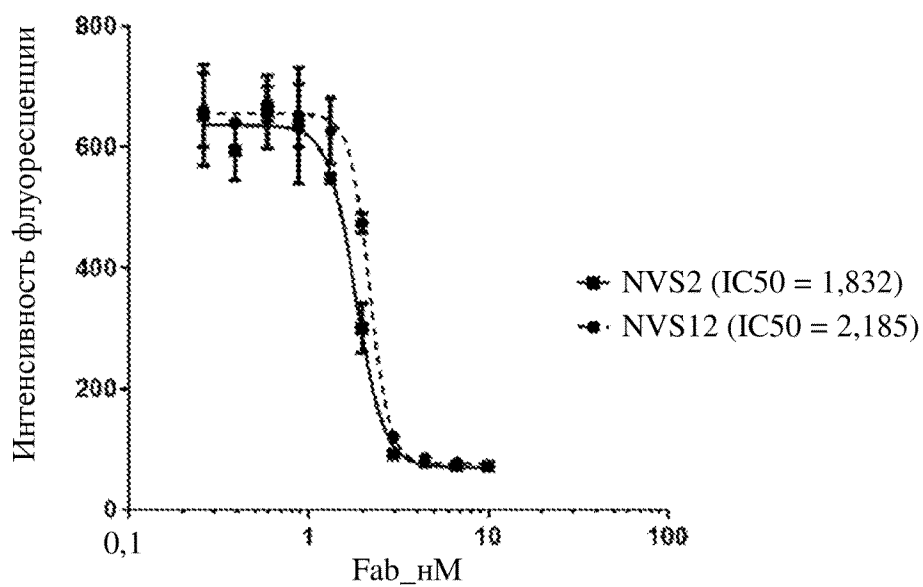


Фиг. 8

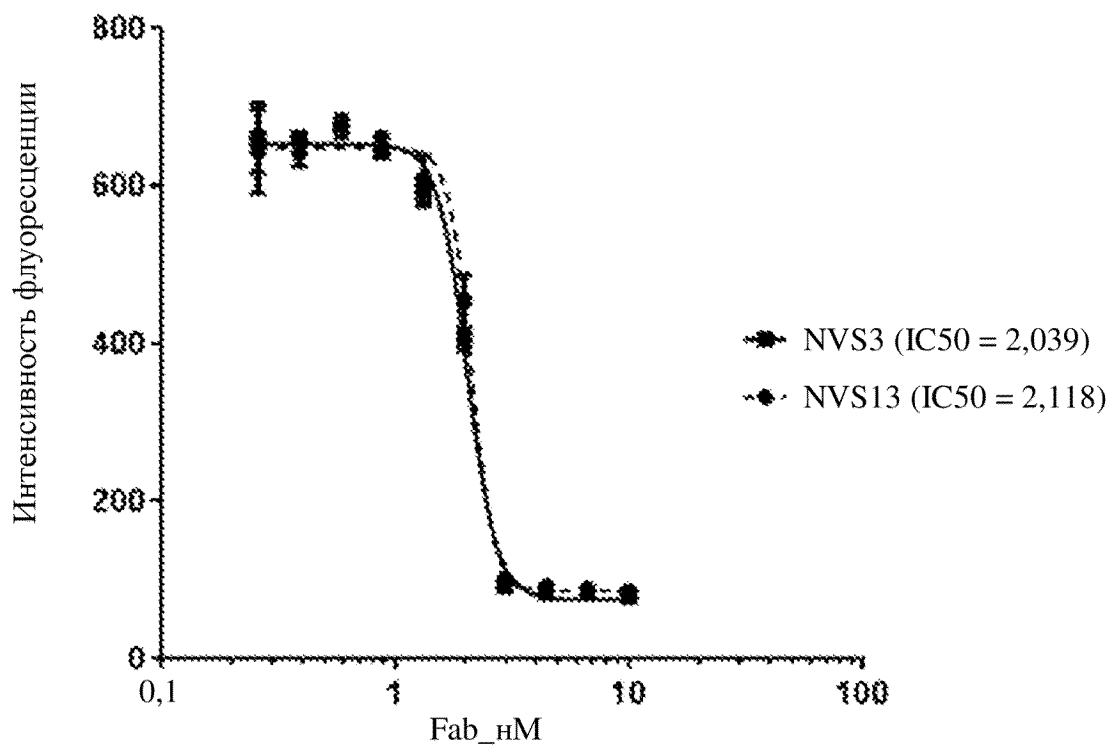
А.



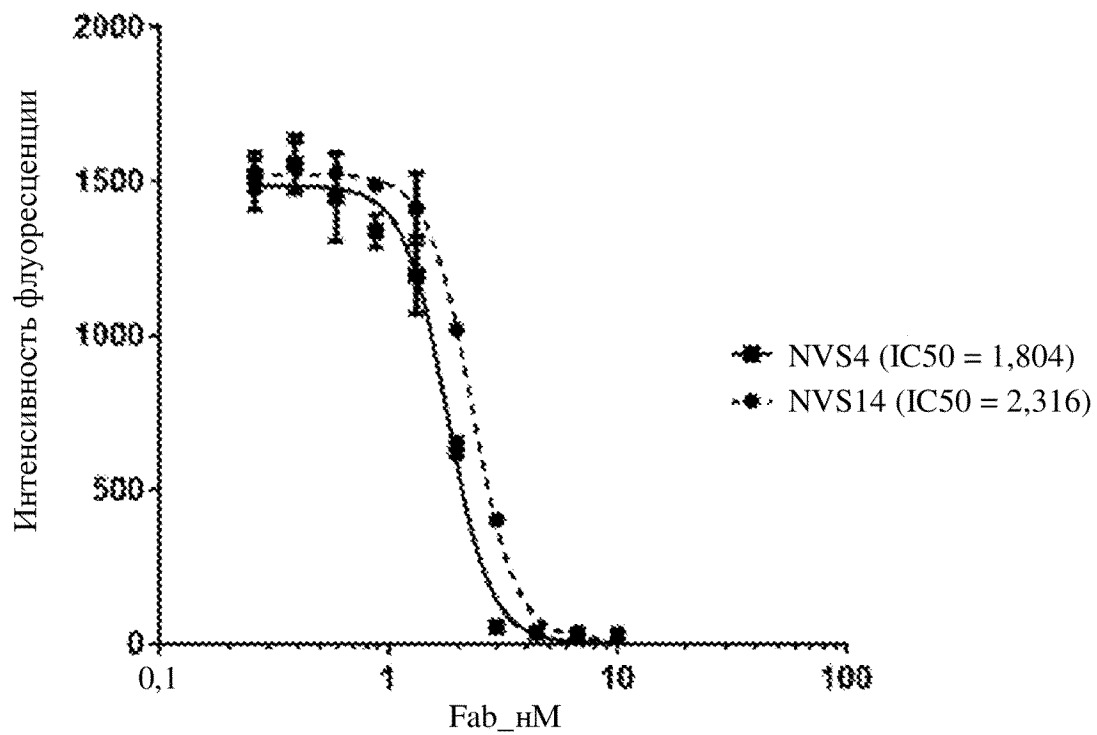
В.



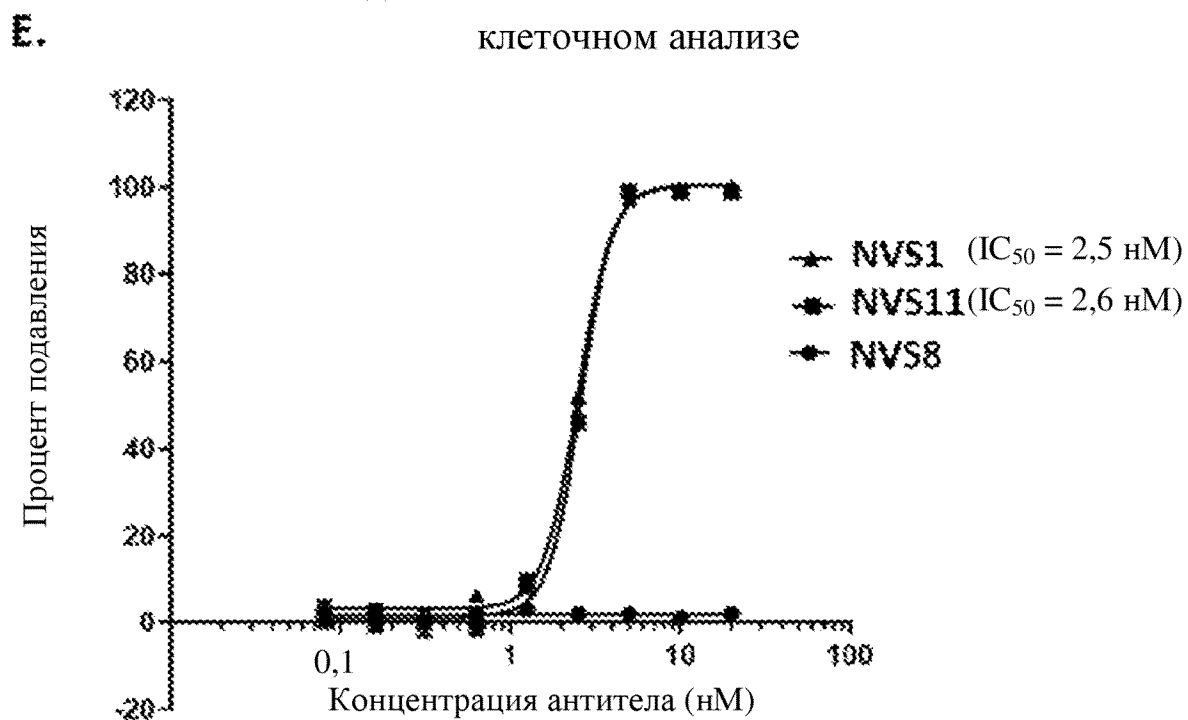
C.



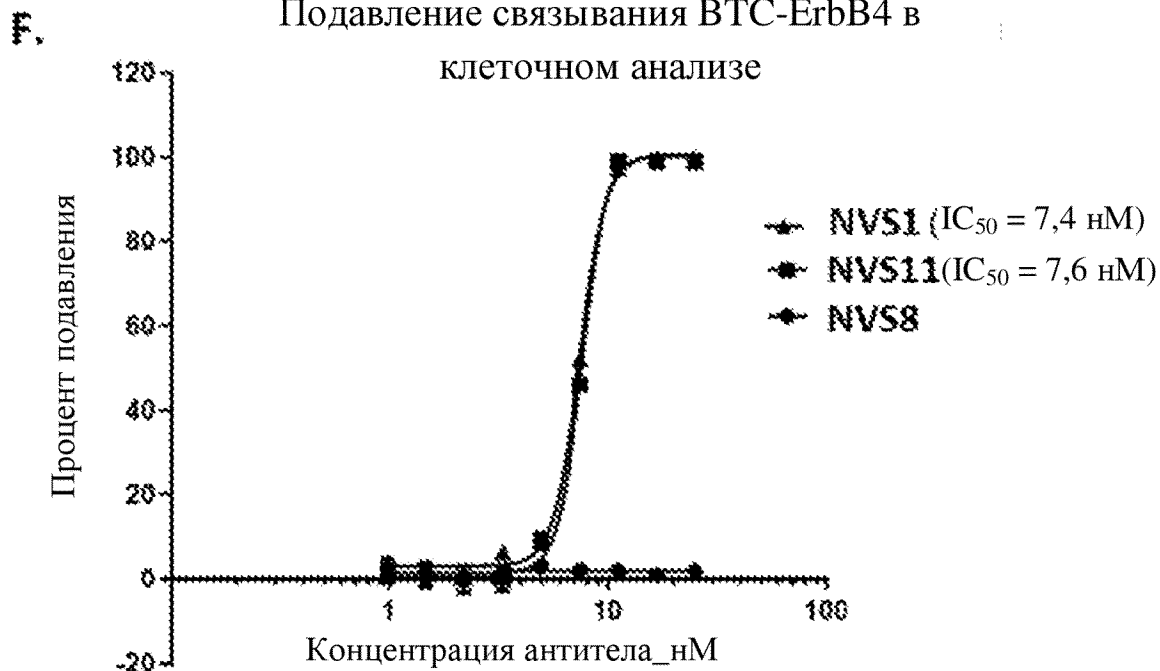
D.

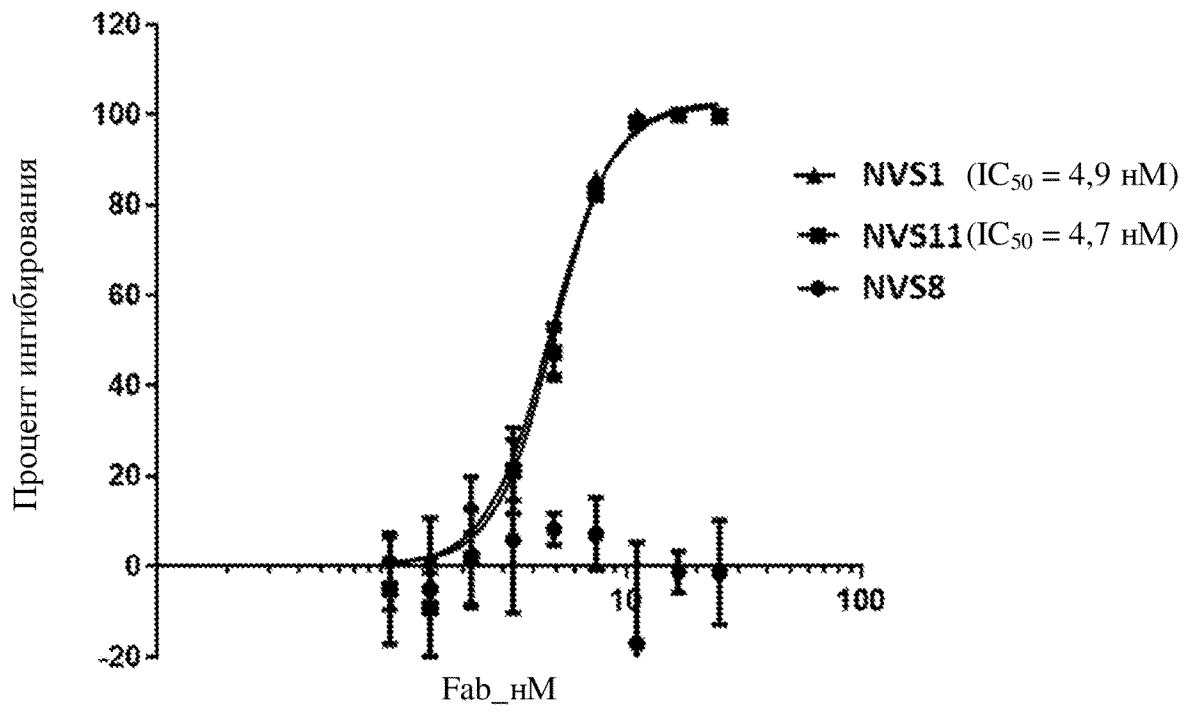


Подавление связывания ВТС-ErbB1 в
клеточном анализе



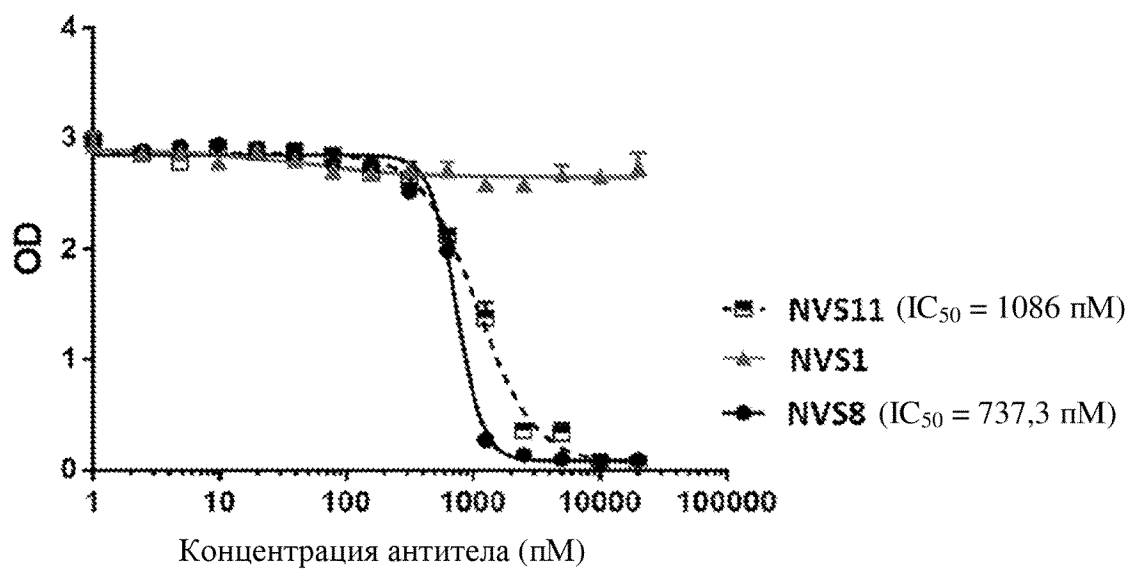
Подавление связывания ВТС-ErbB4 в
клеточном анализе



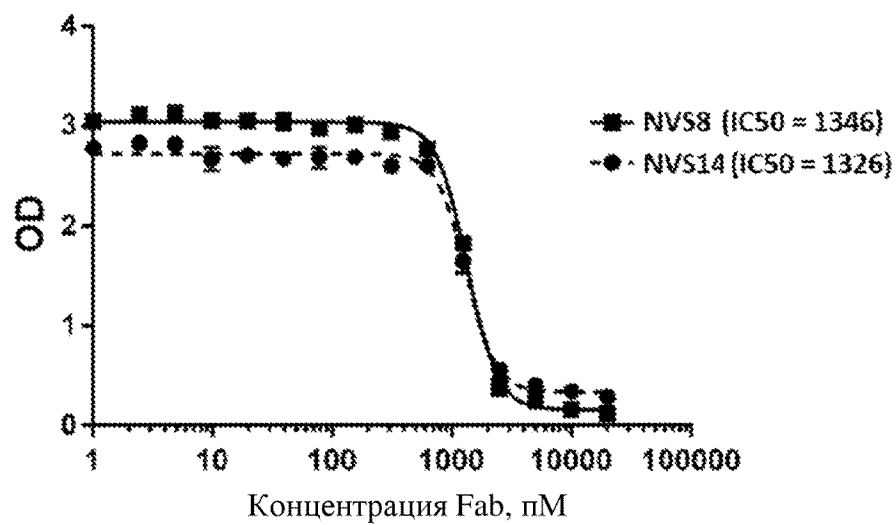
б. ВТС-индуцируемое фосфорилирование EGFR

Фиг. 9

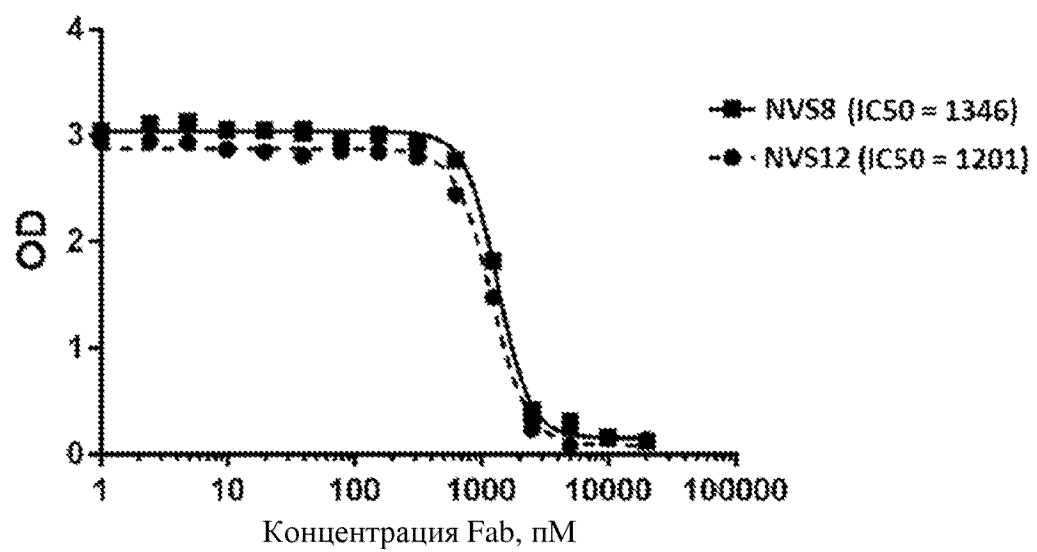
А.



В.

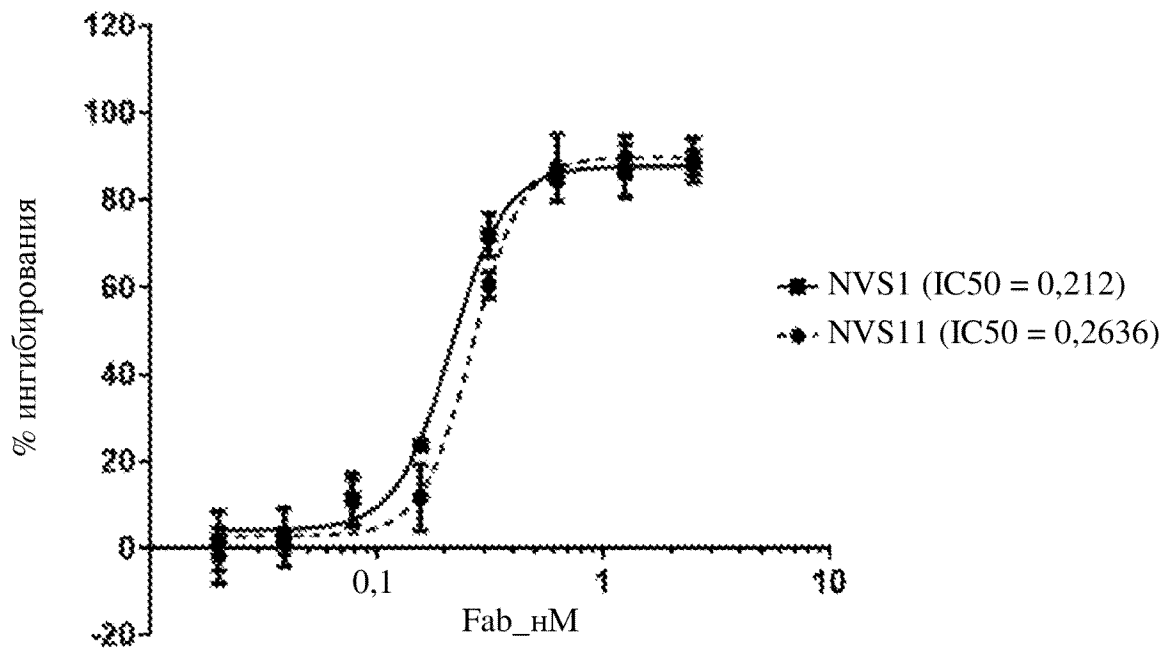


C.

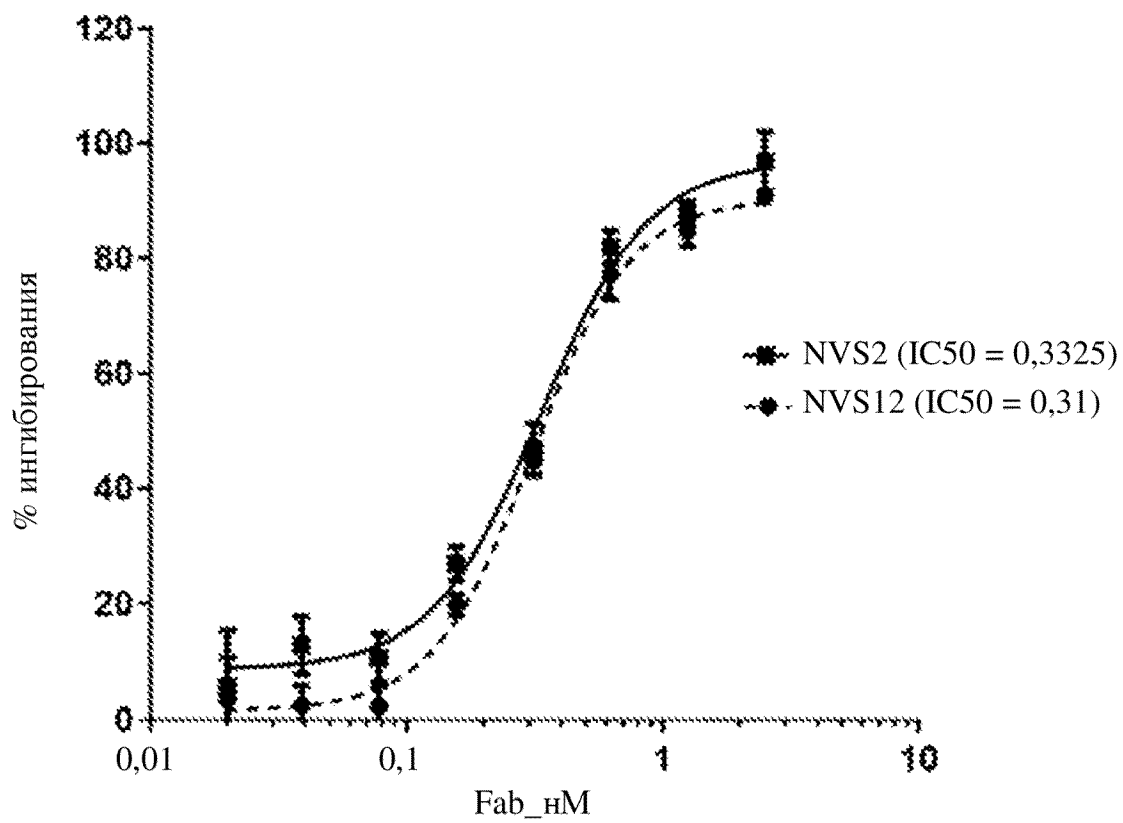


Фиг. 10.

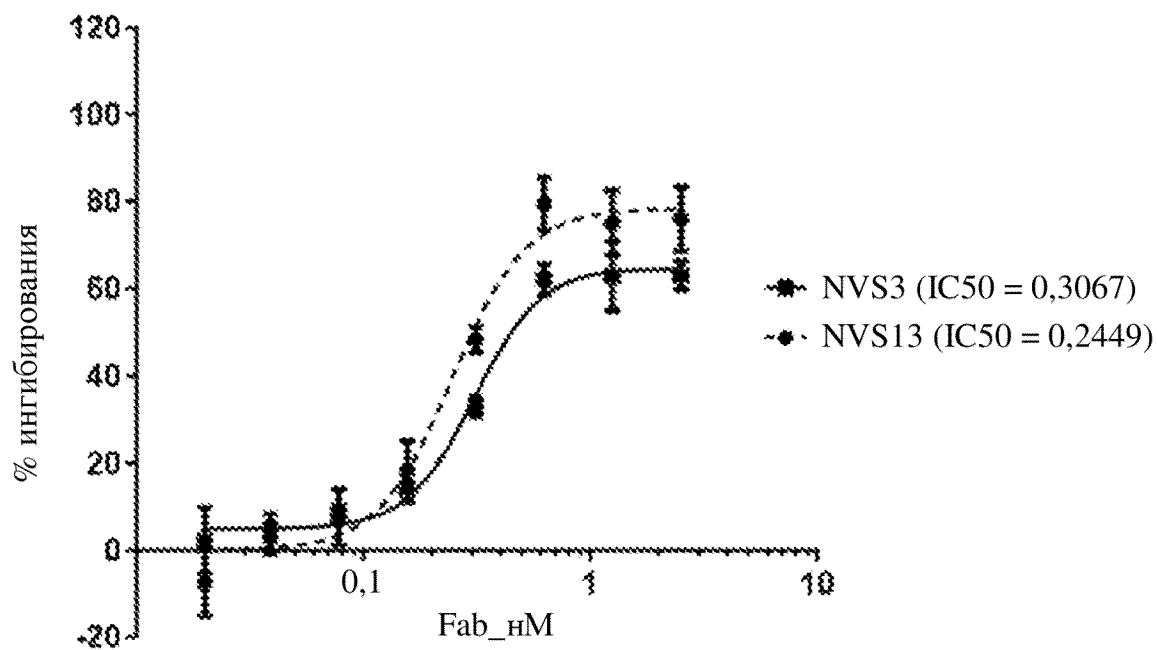
А.



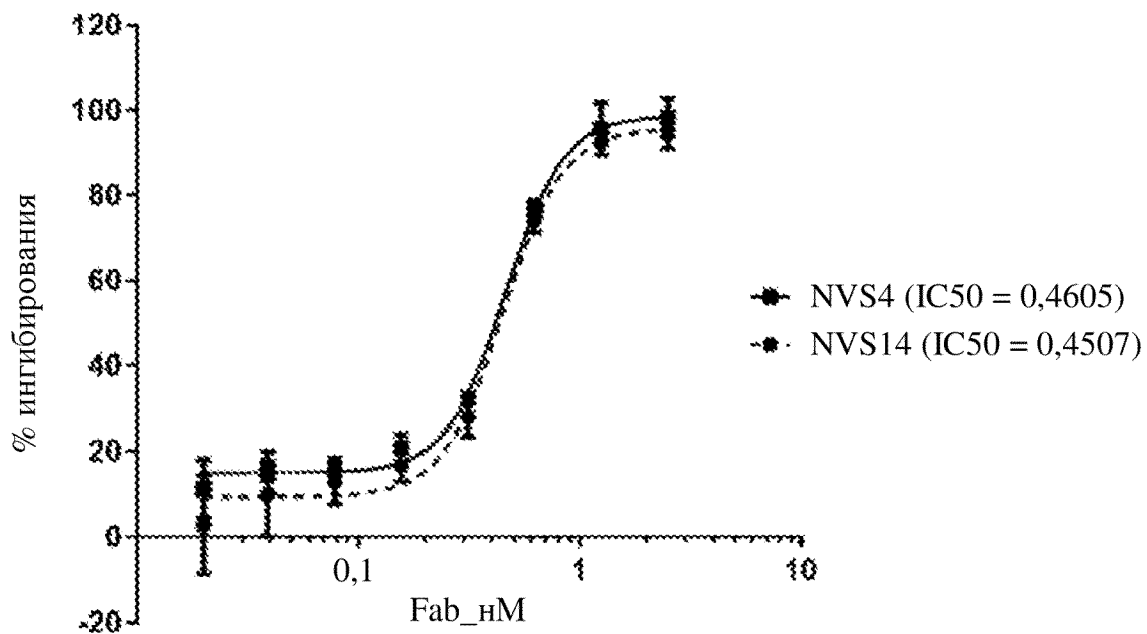
В.



C.

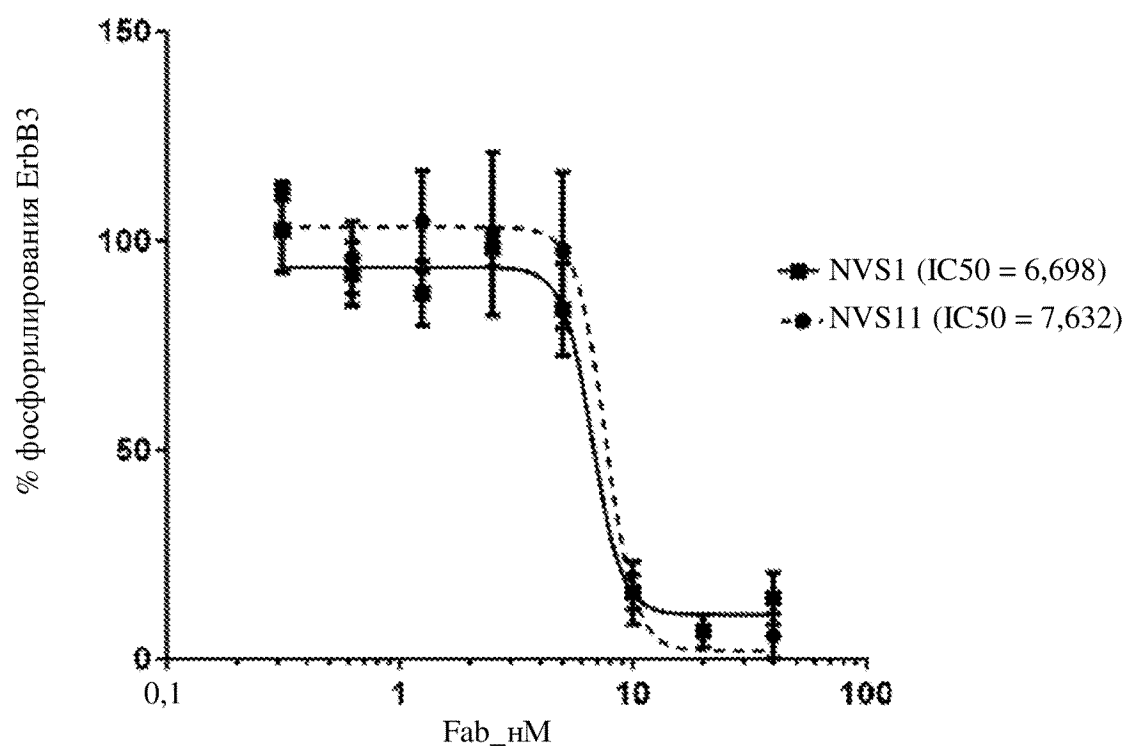


D.

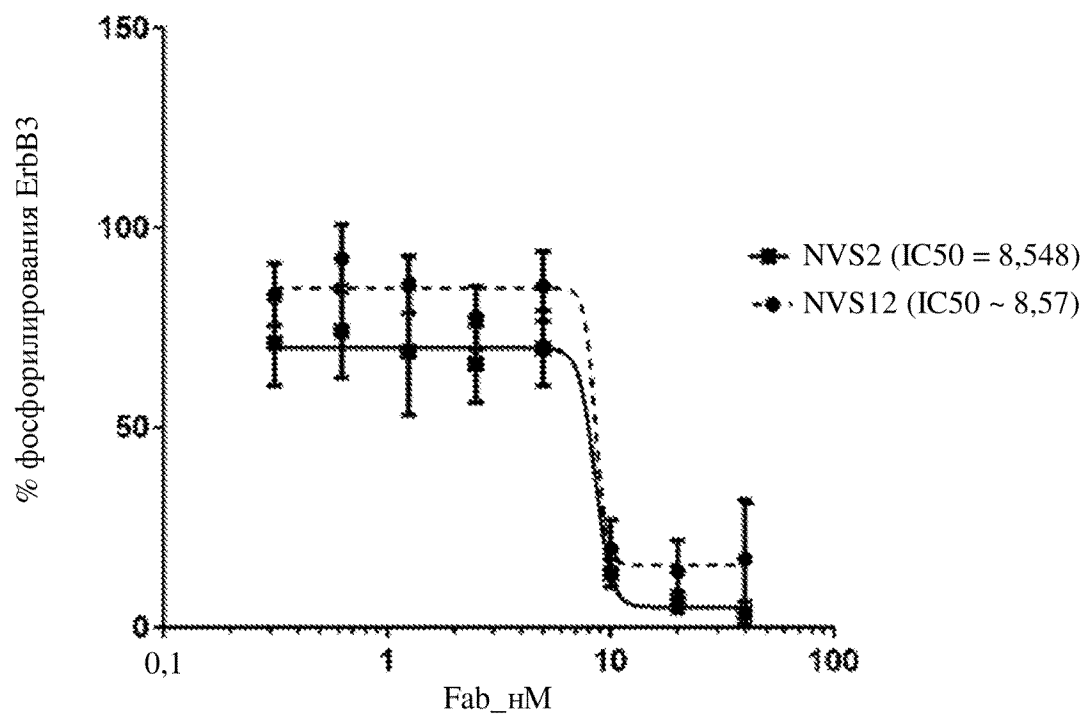


Фиг. 11

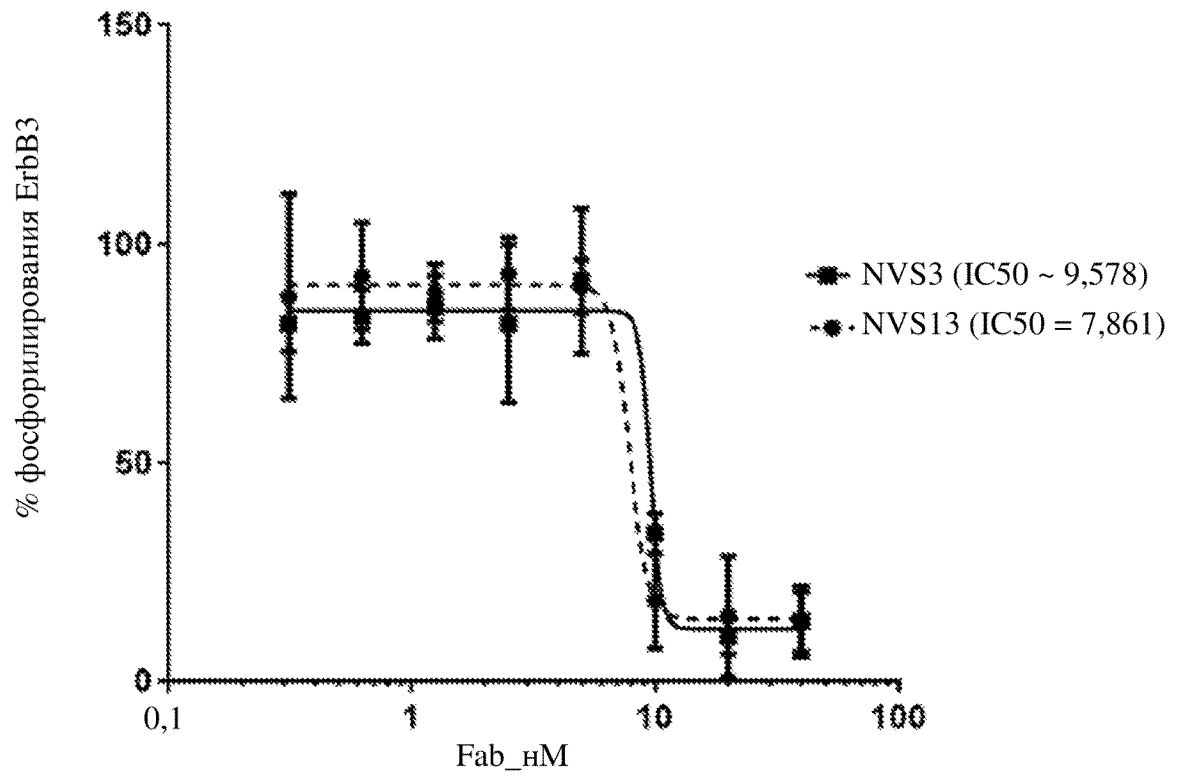
А.



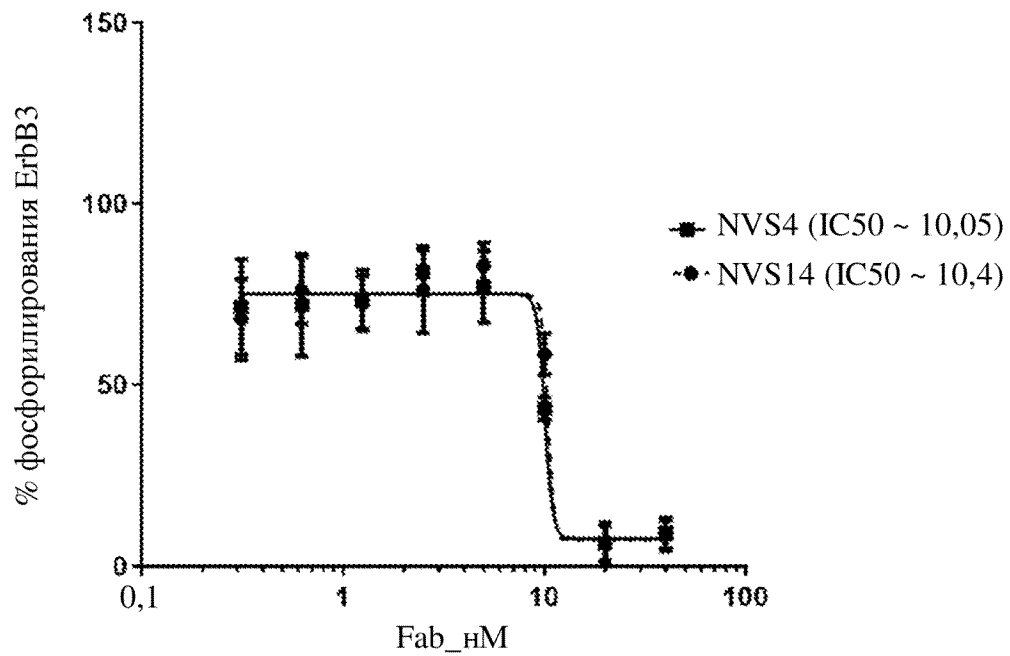
В.



C.

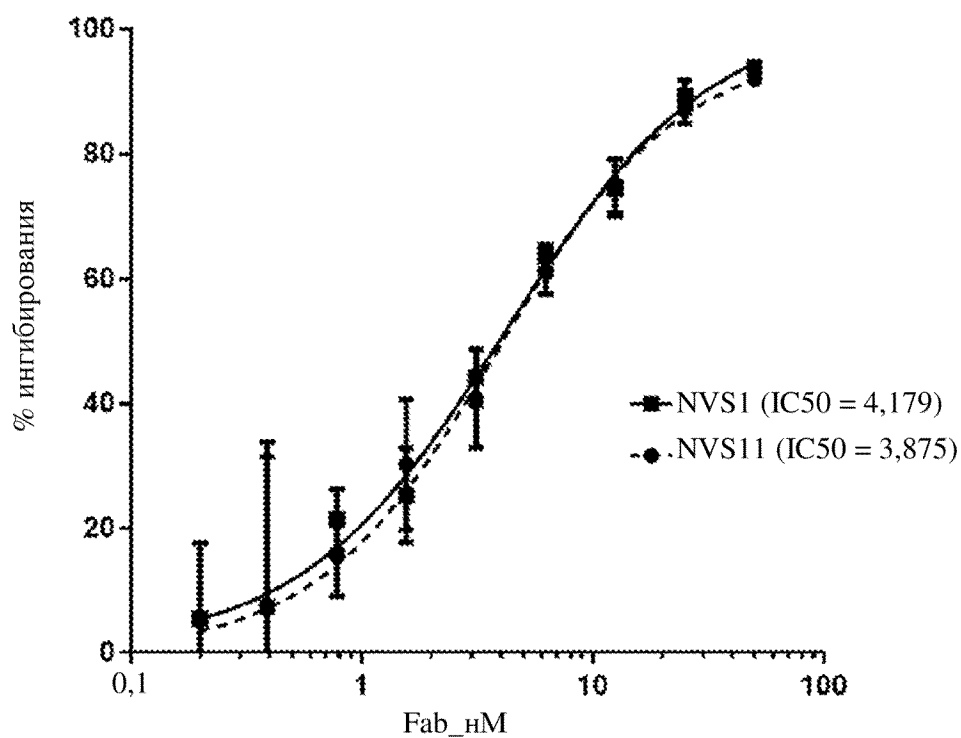


D.

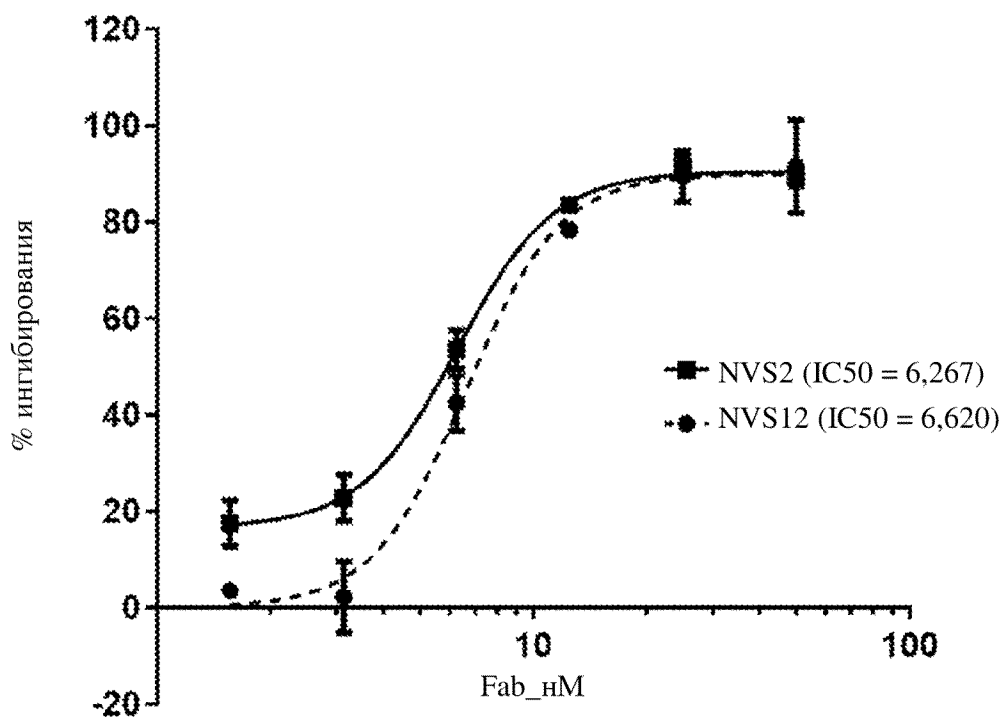


Фиг. 12

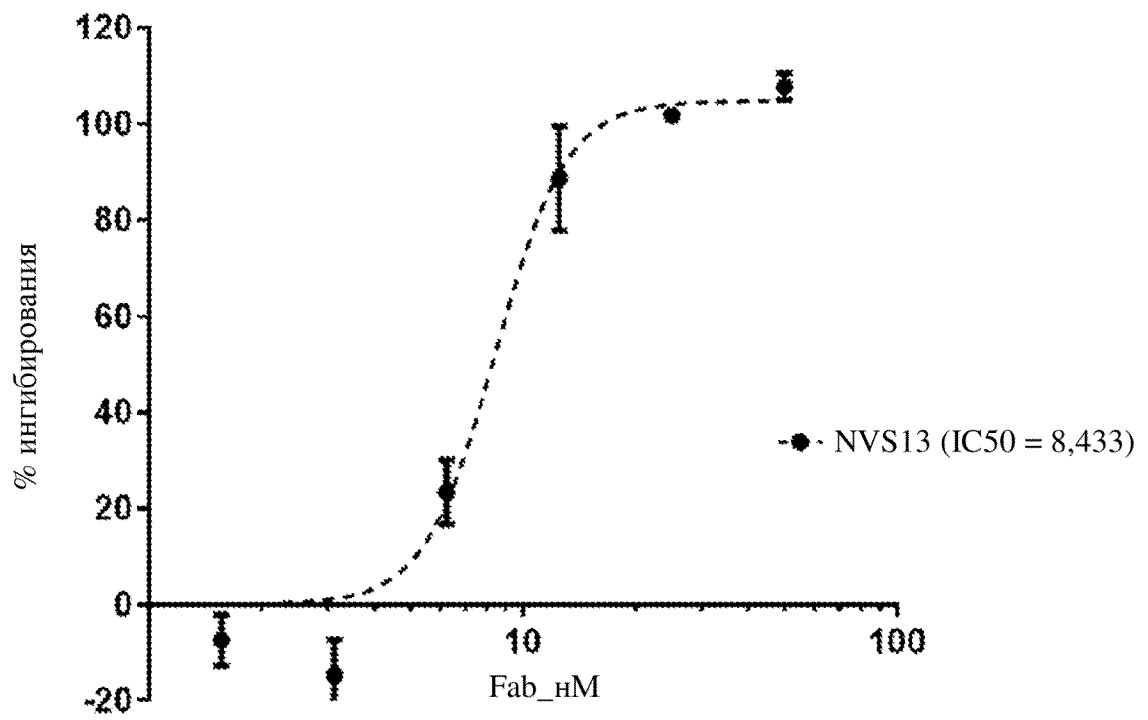
А.



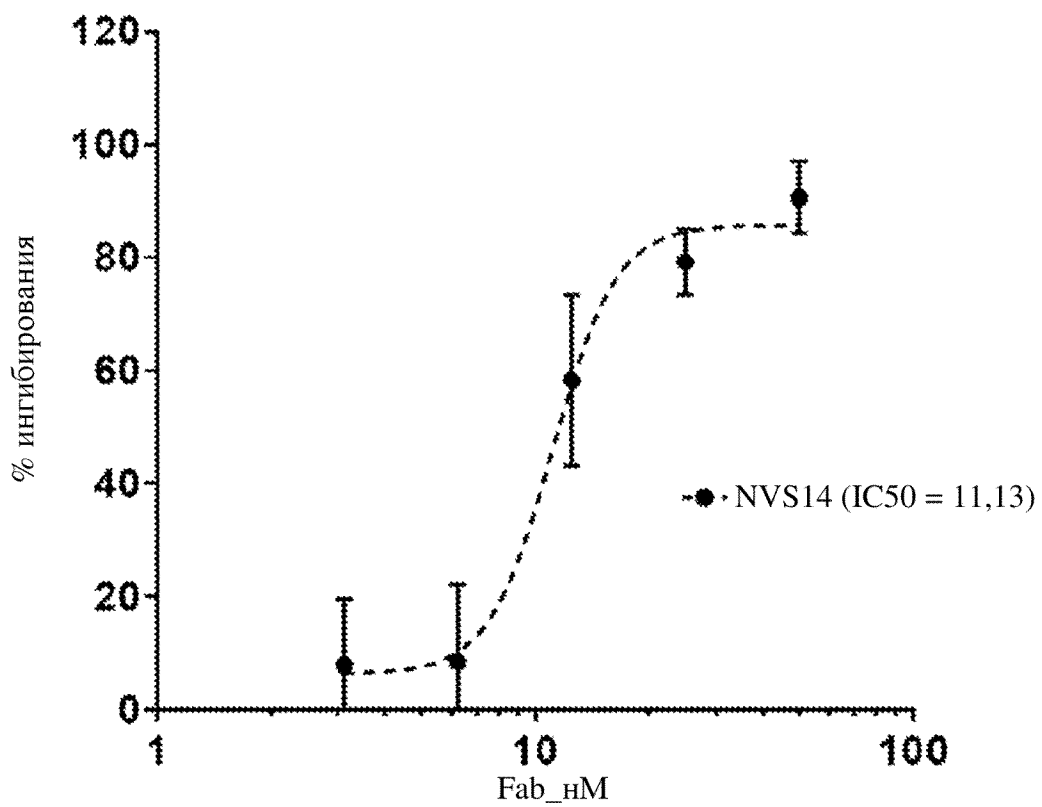
В.



C.

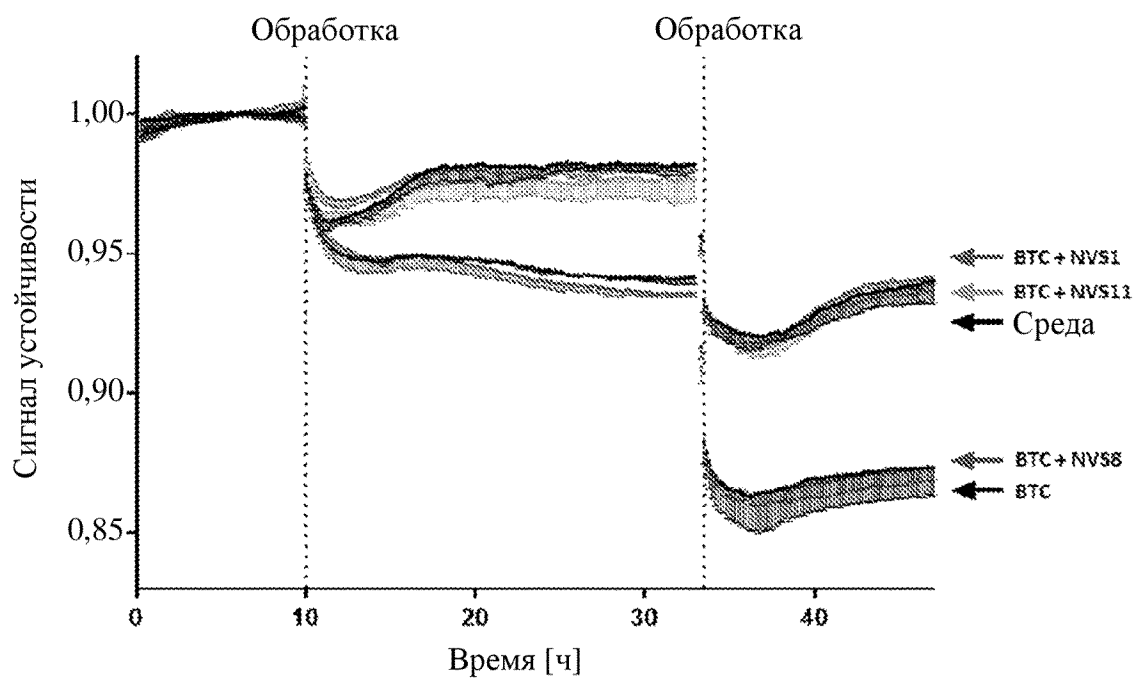


D.

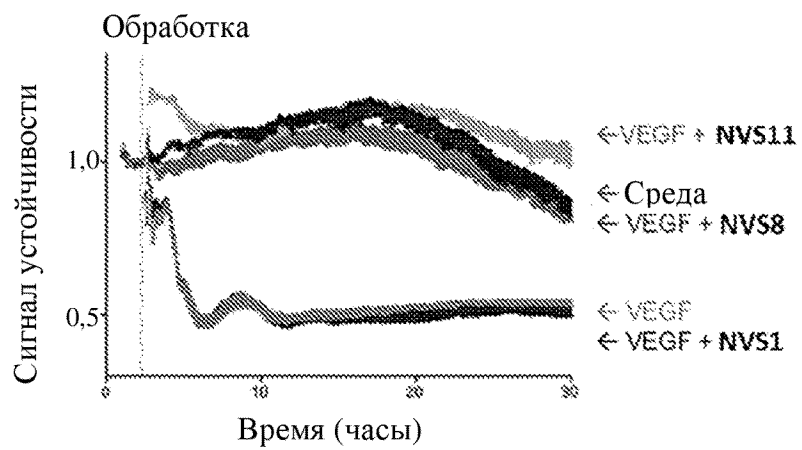


Фиг. 13

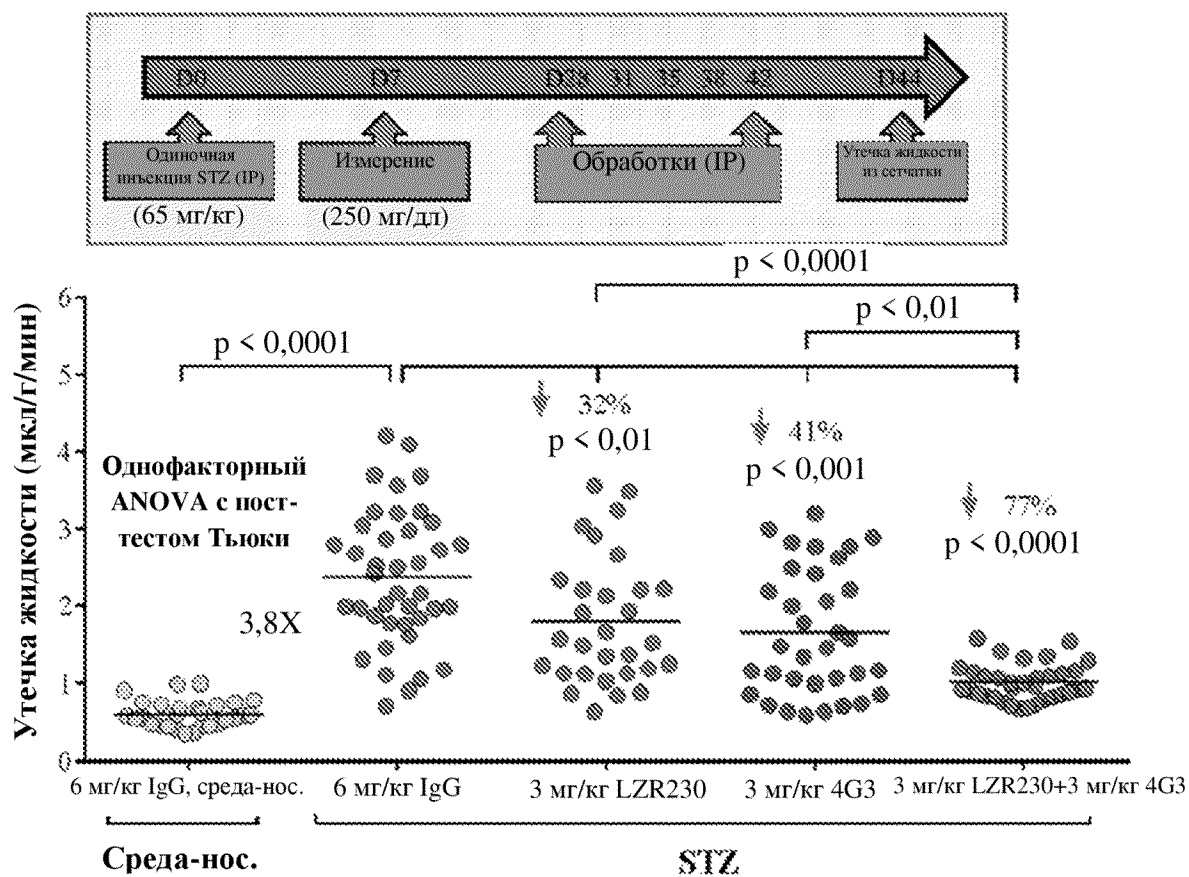
А.



В.

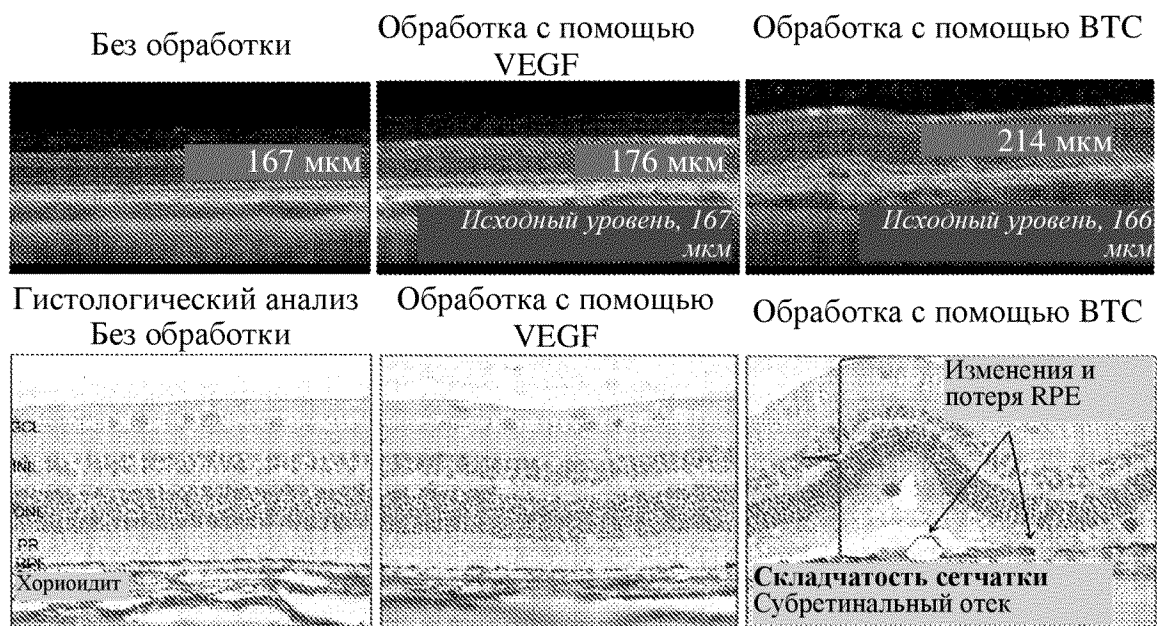


Фиг. 14

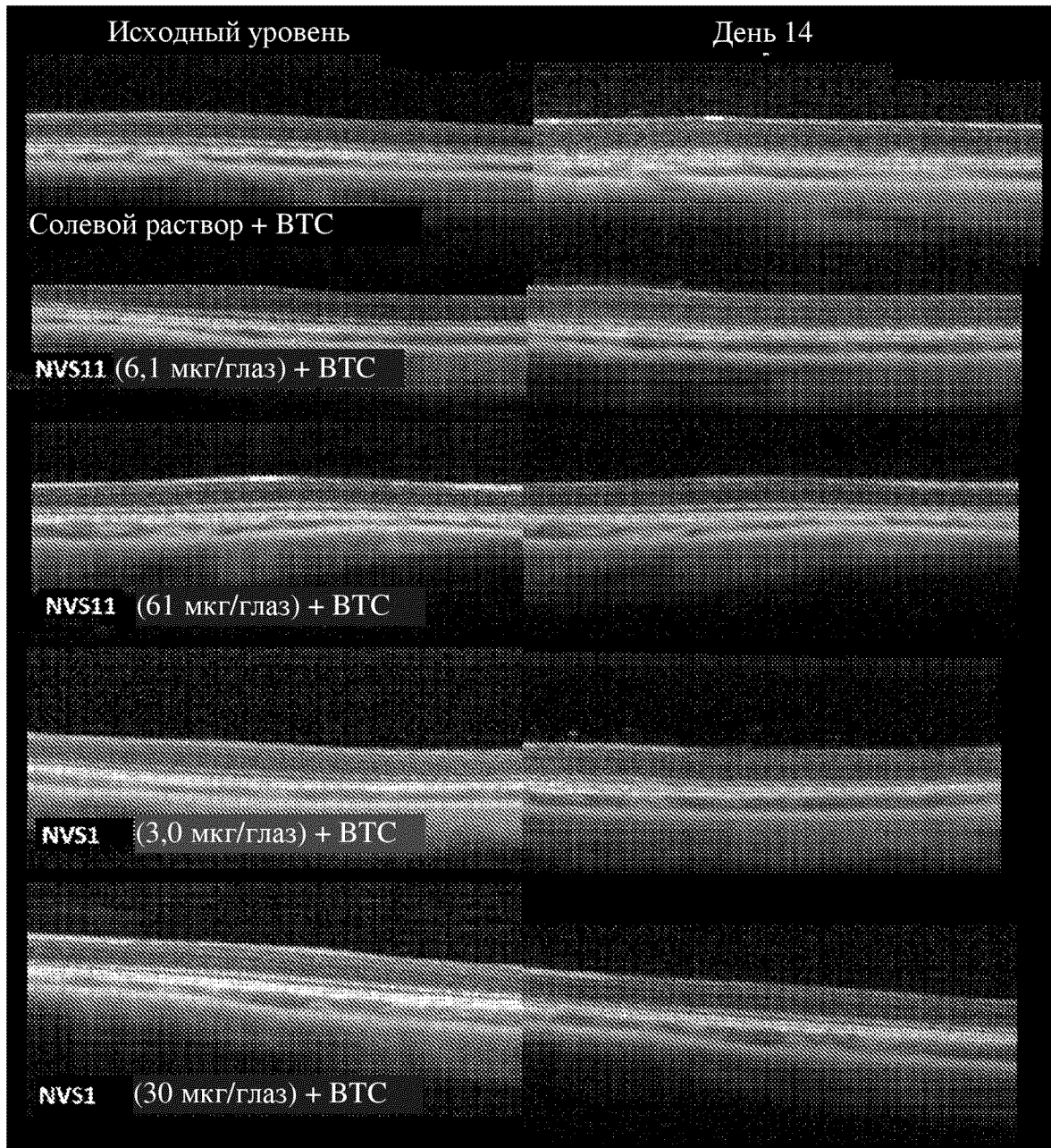


Фиг. 15

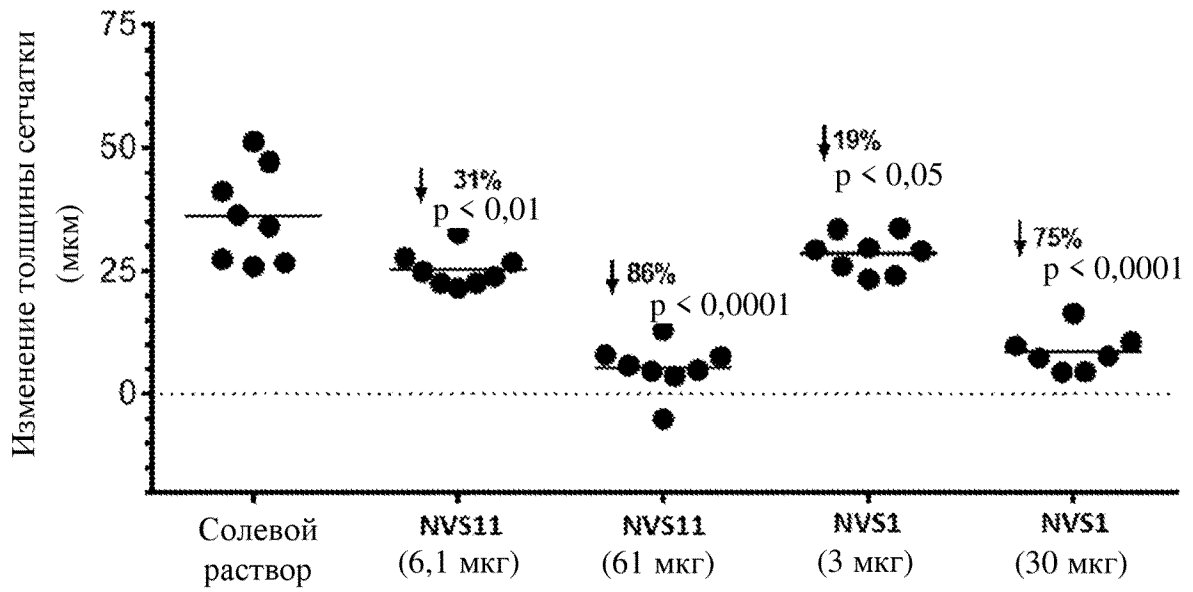
A. Оптическая когерентная томография



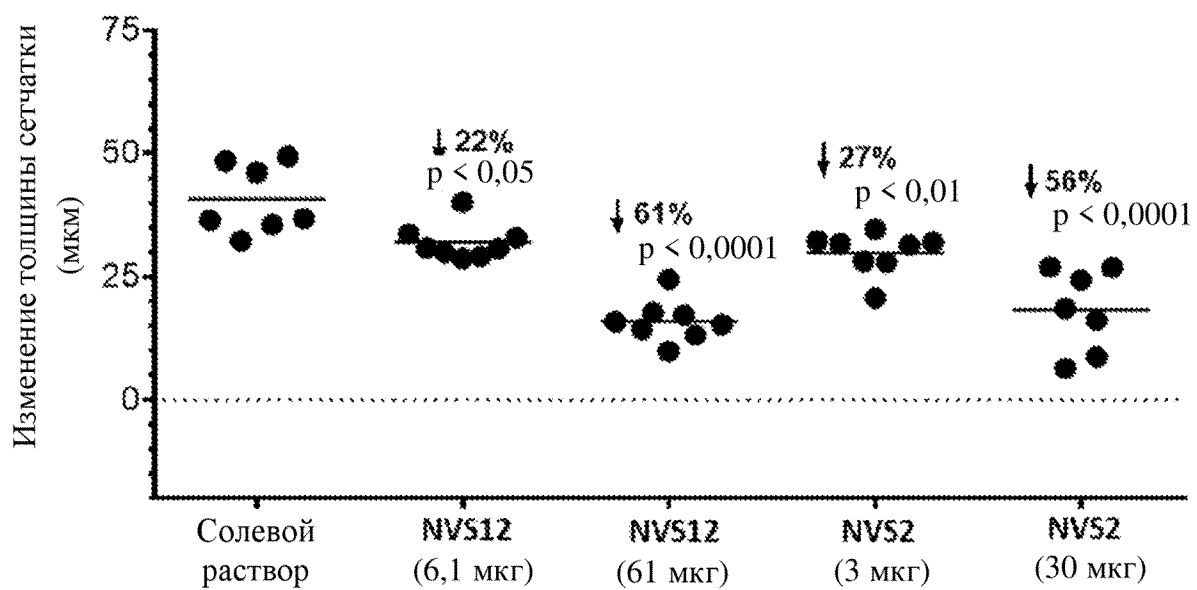
В.



Фиг. 16

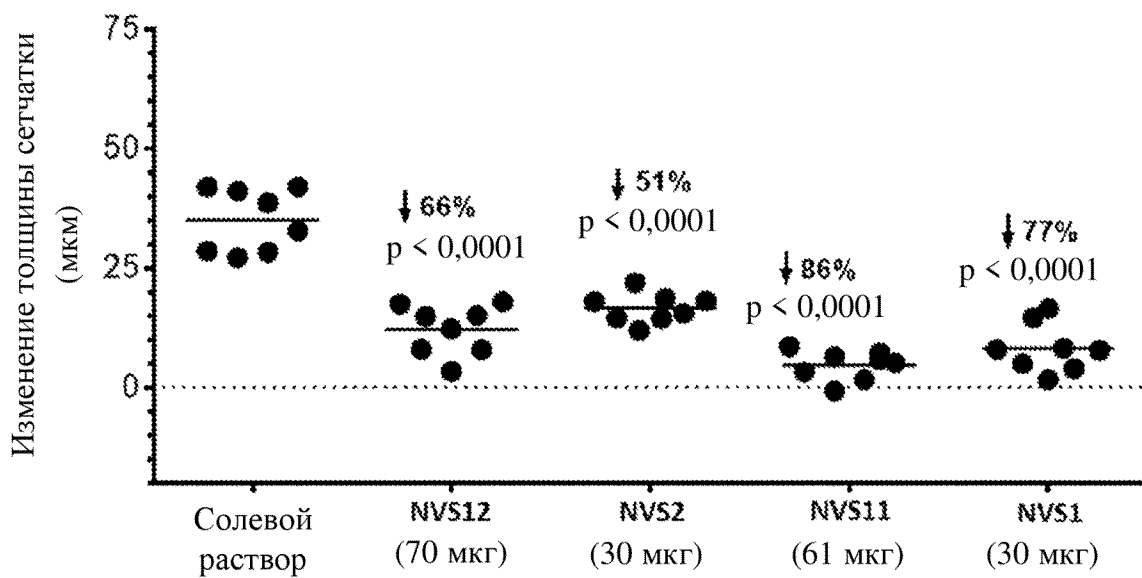


Фиг. 17

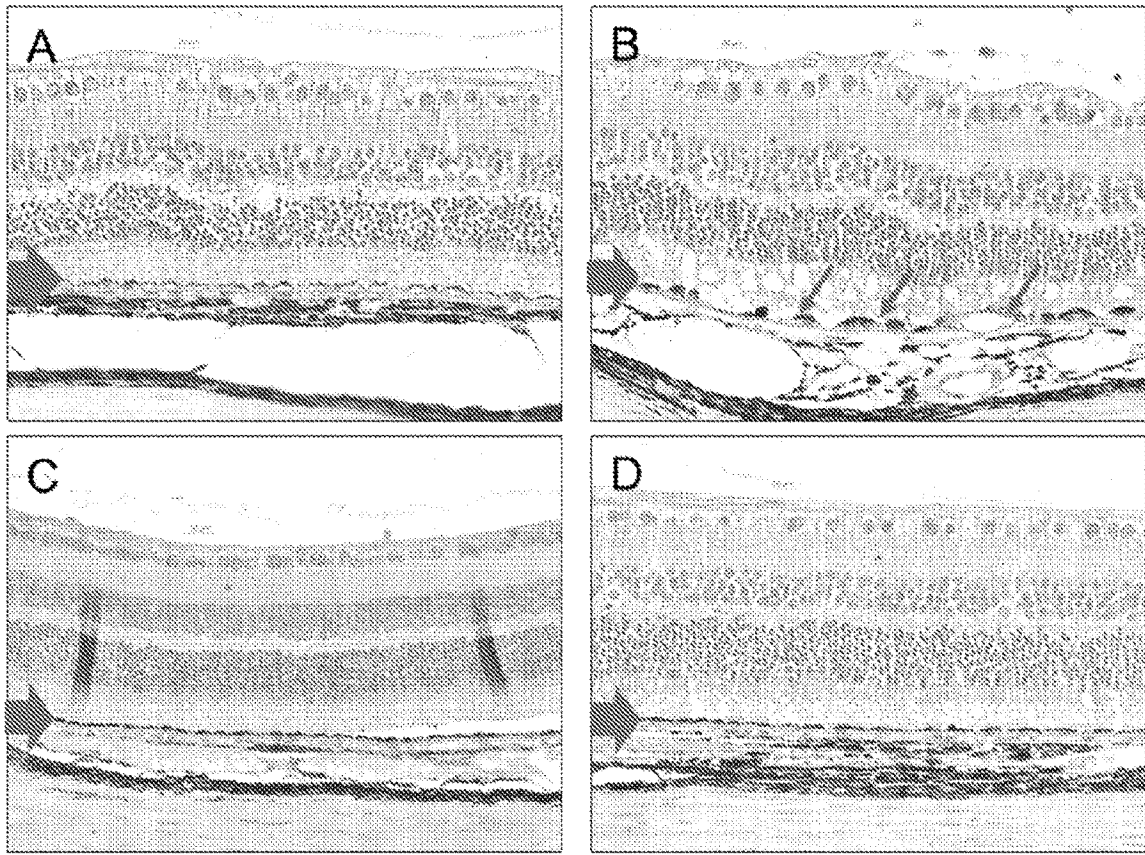


Фиг. 18

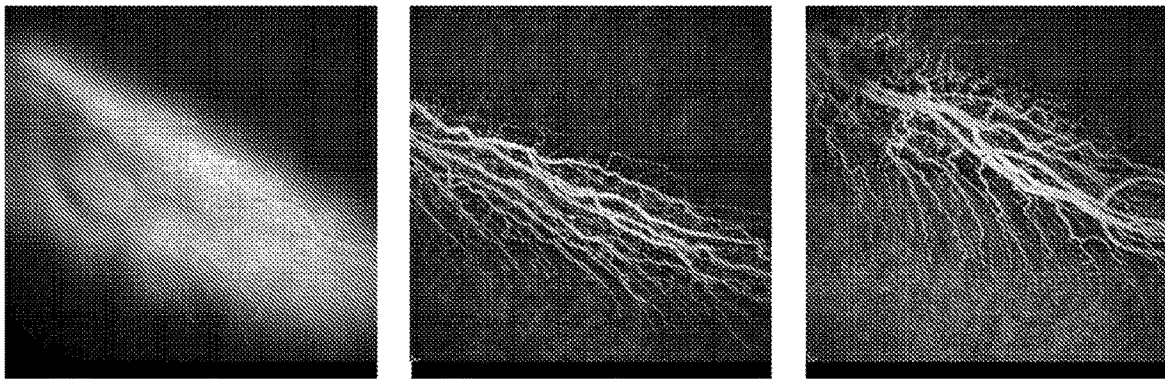
А.



B.



C.

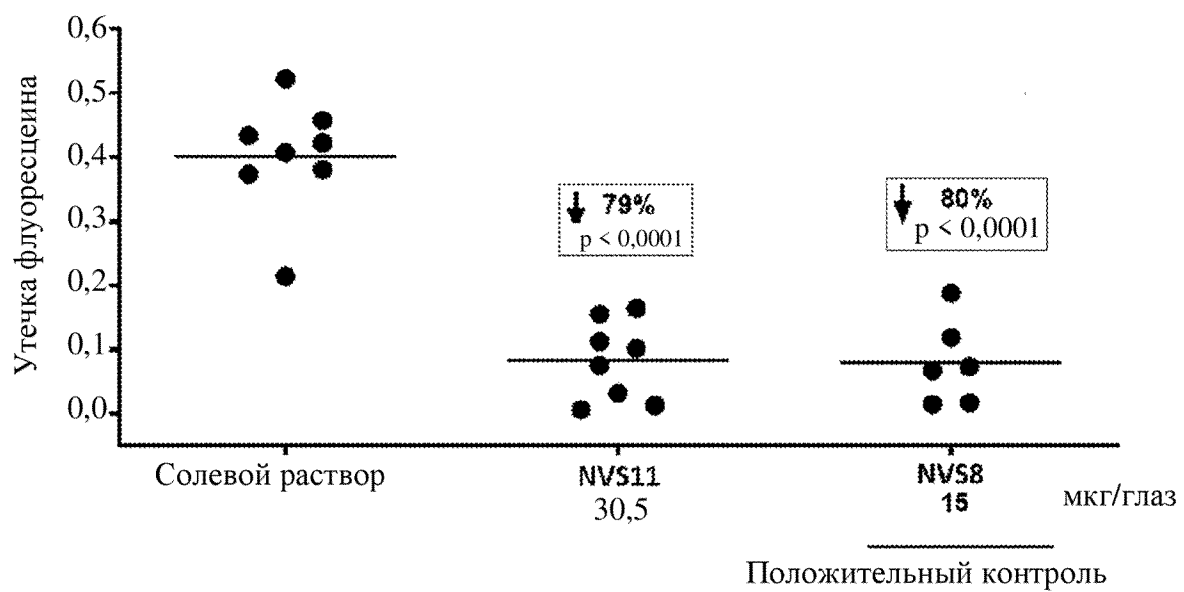


Солевой раствор

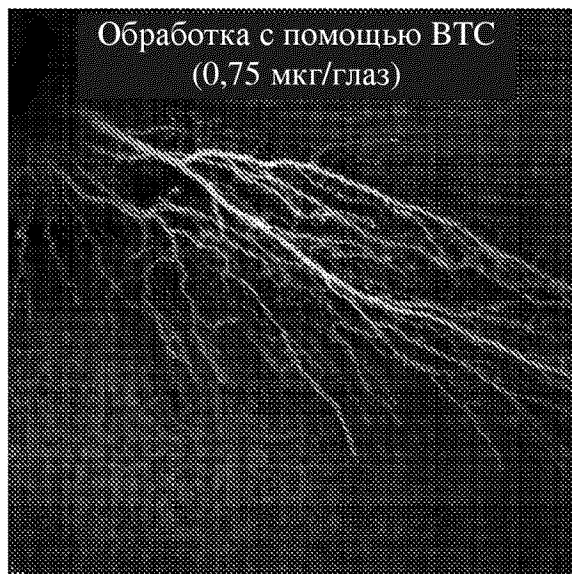
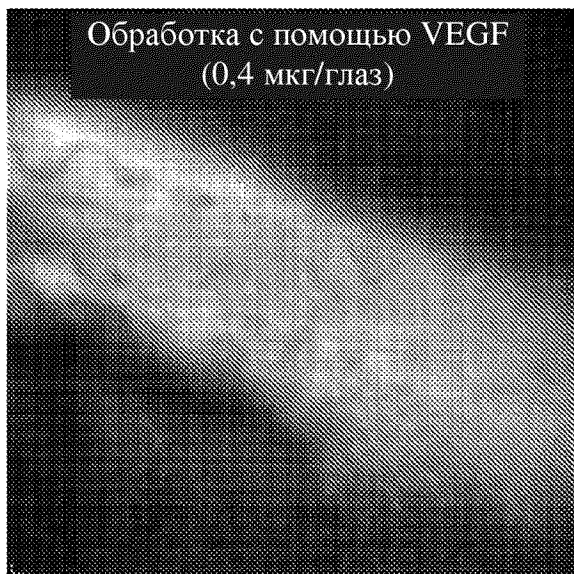
NVS11 (30,5 мкг)

NVS8 (15 мкг)

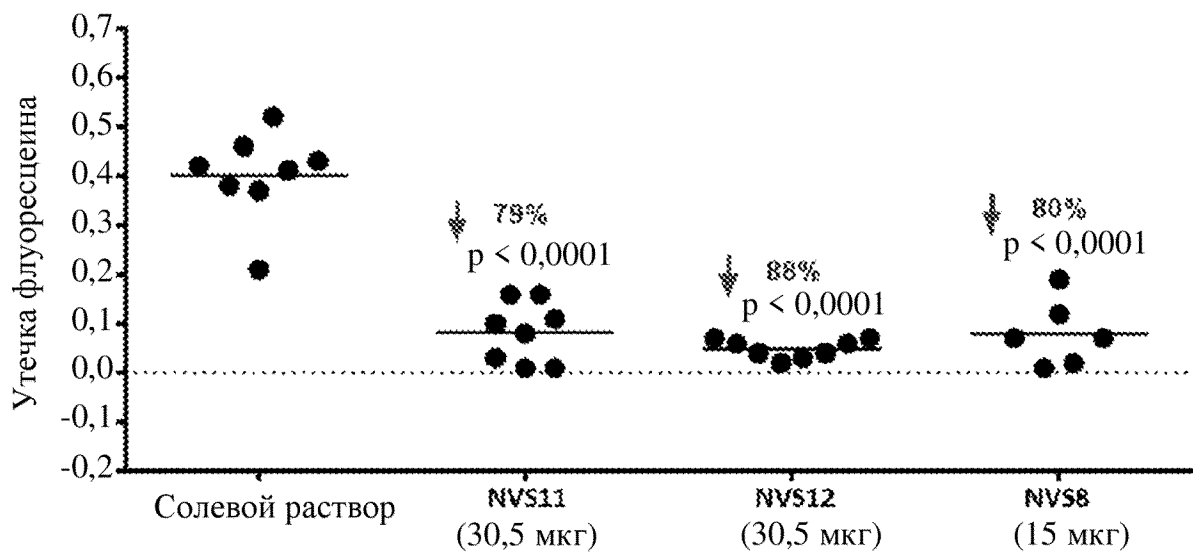
D.



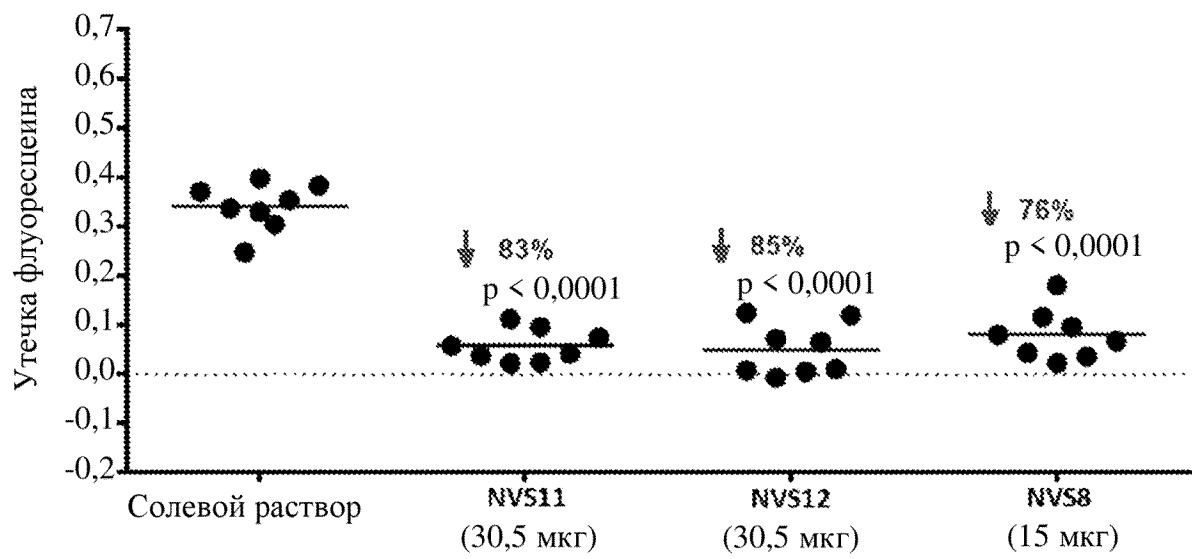
Фиг. 19



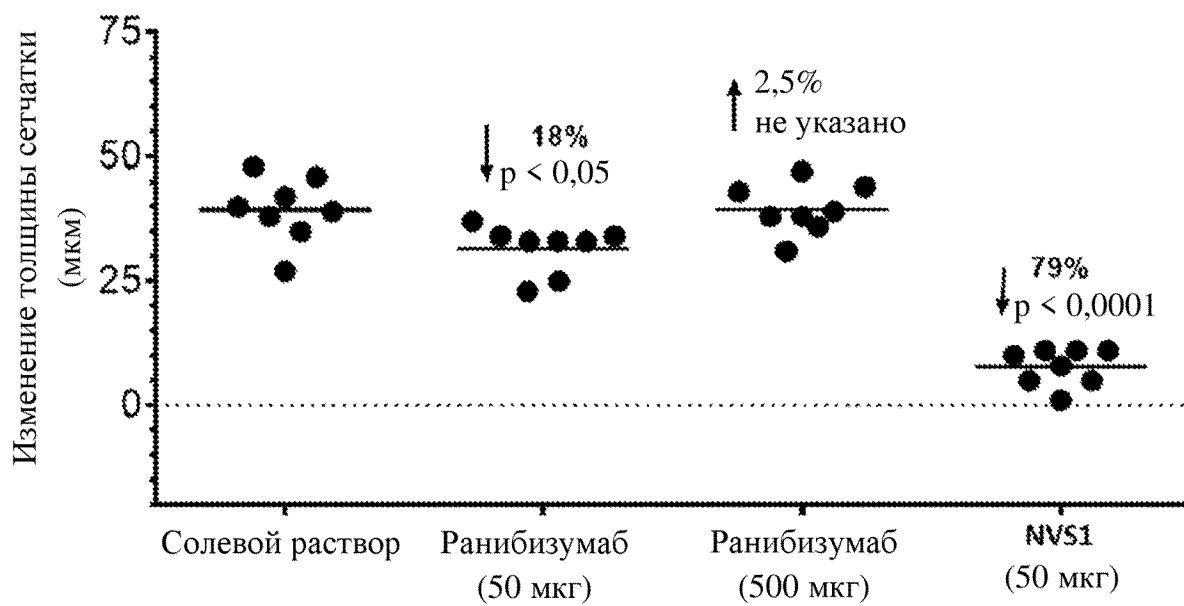
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

