

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046796**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.23

(21) Номер заявки
202091509

(22) Дата подачи заявки
2018.12.19

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

**(54) ААV-ОПОСРЕДОВАННАЯ ДОСТАВКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ВО
ВНУТРЕННЕЕ УХО**

(31) 62/607,665

(32) 2017.12.19

(33) US

(43) 2020.09.22

(86) PCT/US2018/066512

(87) WO 2019/126329 2019.06.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АКУОС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Саймонс Эммануэль Дж., Нг Роберт,
Маккенна Майкл (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2017040528
US-A1-20110052576
WO-A1-2012115980
US-A1-20130078260
LONDON, N. R. et al., 'The role of vascular
endothelial growth factor and vascular stability in
diseases of the ear', The Laryngoscope, August 2014,
Vol. 124, pp. E340-E346. See the whole document

(57) В изобретении предложены способы, которые включают введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора аденоассоциированного вируса (AAV), который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую (a) полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом; (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом; или (c) растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов, функционально связанный с сигнальным пептидом.

B1

046796

046796

B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Данное изобретение испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/607665, поданной 19 декабря 2017 г., полное содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Данное изобретение в целом относится к применению нуклеиновых кислот для лечения потери слуха у субъекта-человека.

Уровень техники

Нервно-сенсорная потеря слуха - это потеря слуха, которая вызвана нарушением работы клеток (например, волосковых клеток) во внутреннем ухе млекопитающего. Неограничивающие причины нейросенсорной потери слуха включают воздействие громкого шума, травмы головы, вирусную инфекцию, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, генетическую потерю слуха, старение, пороки развития внутреннего уха, болезнь Меньера, отосклероз и опухоли.

Сущность изобретения

Данное изобретение относится к способам, которые включают введение во внутреннее ухо млекопитающего (например, человеку) терапевтически эффективного количества любого вектора аденоассоциированного вируса (AAV), который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую (a) полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом и полипептид, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом; или (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом.

В данном документе предложены способы повышения уровня антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела во внутреннем ухе нуждающегося в этом млекопитающего, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую (a) полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом; или (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела, связанный с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к повышению уровня антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела во внутреннем ухе млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела специфически связывается с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела снижают активность VEGF. В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит один или оба из промотора и последовательности Козак, которые функционально связаны с последовательностью, кодирующей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит промотор, выбранный из группы, состоящей из индуцибельного промотора, конститутивного промотора и тканеспецифичного промотора. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее расстройство внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающему был поставлен диагноз расстройство внутреннего уха.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом.

В данном документе также предложены способы лечения расстройства внутреннего уха у нуждающегося в этом млекопитающего, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую (a) полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом; или (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела, связанный с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к лечению расстройства внутреннего уха у млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор

AAV дополнительно содержит один или оба из промотора и последовательности Козак, которые функционально связаны с последовательностью, кодирующей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит промотор, выбранный из группы, состоящей из индуцибельного промотора, конститутивного промотора и тканеспецифичного промотора.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее расстройство внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающему был поставлен диагноз расстройство внутреннего уха.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом.

В данном документе также предложены способы снижения активности VEGF во внутреннем ухе нуждающегося в этом млекопитающего, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую (a) полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом; или (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела, связанный с сигнальным пептидом; при этом полипептид согласно (a) кодирует антитело, которое специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF, полипептид согласно (b) кодирует антигенсвязывающий фрагмент антитела, который специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF; при этом введение приводит к снижению активности VEGF во внутреннем ухе млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит один или оба из промотора и последовательности Козак, которые функционально связаны с последовательностью, кодирующей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит промотор, выбранный из группы, состоящей из индуцибельного промотора, конститутивного промотора и тканеспецифичного промотора.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее акустическую неврому, или ему был поставлен такой диагноз. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее было идентифицировано как имеющее вестибулярную шванному, или ему был поставлен такой диагноз. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее нейрофиброматоз 2-го типа, или ему был поставлен такой диагноз.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом.

В данном документе также предложены способы лечения акустической невромы, вестибулярной шванномы, нейрофиброматоза 2-го типа во внутреннем ухе млекопитающего, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую (a) полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом; или (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела, связанный с сигнальным

пептидом; при этом полипептид согласно (а) кодирует антитело, которое специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF, полипептид согласно (b) кодирует антигенсвязывающий фрагмент антитела, который специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF; при этом введение приводит к лечению акустической невromы, вестибулярной шванномы, нейрофиброматоза 2-го типа, соответственно, во внутреннем ухе млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит один или оба из промотора и последовательности Козака, которые функционально связаны с последовательностью, кодирующей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела.

В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор AAV содержит промотор, выбранный из группы, состоящей из индуцибельного промотора, конститутивного промотора и тканеспецифичного промотора.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее акустическую невromу, или ему был поставлен такой диагноз. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее вестибулярную шванному, или ему был поставлен такой диагноз. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее нейрофиброматоз 2-го типа, или ему был поставлен такой диагноз.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, антитело содержит область Fc, которая содержит одну или более аминокислотных замен, которые уменьшают период полужизни антитела у млекопитающего по сравнению с контрольным антителом; или его антигенсвязывающий фрагмент антитела имеет уменьшенный период полужизни *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим фрагментом антитела.

В данном документе также предложены способы, включающие введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора аденоассоциированного вируса (AAV), который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), функционально связанный с сигнальным пептидом.

В данном документе также предложены способы повышения уровня растворимого рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) во внутреннем ухе нуждающегося в этом млекопитающего, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую растворимый рецептор VEGF, функционально связанный с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к повышению уровня растворимого рецептора VEGF во внутреннем ухе млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области рецептора VEGF-1 (VEGFR-1). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-1 содержит непрерывную последовательность из VEGFR-1 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-1 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области из VEGFR-1 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична непрерывной последовательности из VEGFR-1 человека дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области рецептора VEGF-2 (VEGFR-2). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-2 содержит непрерывную последовательность из VEGFR-2 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-2 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области из VEGFR-2 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из спосо-

бов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-2 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична непрерывной последовательности из VEGFR-2 человека дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области VEGFR-1 и часть внеклеточной области VEGFR-2. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-1 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-1 человека дикого типа; и часть внеклеточной области VEGFR-2 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-2 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF представляет собой афлиберцепт.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области рецептора VEGF-3 (VEGFR-3). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-3 содержит непрерывную последовательность из VEGFR-3 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-3 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области из VEGFR-3 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-3 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична непрерывной последовательности из VEGFR-3 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF содержит домен Fc. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, домен Fc представляет собой домен Fc IgG1. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, домен Fc IgG1 представляет собой домен Fc IgG1 человека дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF уменьшает способность VEGF связываться с одним или более из VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3.

В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит один или оба из промотора и последовательности Козака, которые функционально связаны с последовательностью, кодирующей растворимый рецептор VEGF. В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор AAV содержит промотор, выбранный из группы: индуцибельного промотора, конститутивного промотора и тканеспецифичного промотора. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее расстройство внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающему был поставлен диагноз расстройство внутреннего уха.

В данном документе также предложены способы лечения расстройства внутреннего уха у нуждающегося в этом млекопитающего, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), функционально связанный с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к лечению расстройства внутреннего уха у млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит один или оба из промотора и последовательности Козака, которые функционально связаны с последовательностью, кодирующей растворимый рецептор VEGF. В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор AAV содержит промотор, выбранный из группы: индуцибельного промотора, конститутивного промотора и тканеспецифичного промотора. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее расстройство внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающему был поставлен диагноз расстройство внутреннего уха.

В данном документе также предложены способы снижения активности VEGF во внутреннем ухе нуждающегося в этом млекопитающего, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), функциональ-

но связанный с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к снижению активности VEGF во внутреннем ухе млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит один или оба из промотора и последовательности Козака, которые функционально связаны с последовательностью, кодирующей растворимый рецептор VEGF. В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор AAV содержит промотор, выбранный из группы: индуцибельного промотора, конститутивного промотора и тканеспецифичного промотора. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее акустическую неврому, или ему был поставлен такой диагноз. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее вестибулярную шванному, или ему был поставлен такой диагноз. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее нейрофиброматоз 2-го типа, или ему был поставлен такой диагноз.

В данном документе также предложены способы лечения акустической невromы, вестибулярной шванномы или нейрофиброматоза 2-го типа во внутреннем ухе млекопитающего, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), функционально связанный с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к лечению акустической невromы, вестибулярной шванномы или нейрофиброматоза 2-го типа, соответственно, во внутреннем ухе млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит один или оба из промотора и последовательности Козака, которые функционально связаны с последовательностью, кодирующей растворимый рецептор VEGF. В некоторых вариантах осуществления любых способов, раскрытых в данном документе, вектор AAV содержит промотор, выбранный из группы: индуцибельного промотора, конститутивного промотора и тканеспецифичного промотора. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее акустическую неврому, или ему был поставлен такой диагноз. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее вестибулярную шванному, или ему был поставлен такой диагноз. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, млекопитающее было идентифицировано как имеющее нейрофиброматоз 2-го типа, или ему был поставлен такой диагноз.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области рецептора VEGF-1 (VEGFR-1). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-1 содержит непрерывную последовательность из VEGFR-1 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-1 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области из VEGFR-1 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична непрерывной последовательности из VEGFR-1 человека дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области рецептора VEGF-2 (VEGFR-2). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-2 содержит непрерывную последовательность из VEGFR-2 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-2 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области из VEGFR-2 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-2 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична непрерывной последовательности из VEGFR-2 человека дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области VEGFR-1 и часть внеклеточной области VEGFR-2. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе,

часть внеклеточной области VEGFR-1 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-1 человека дикого типа; и часть внеклеточной области VEGFR-2 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-2 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF представляет собой афлиберцепт.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области рецептора VEGF-3 (VEGFR-3). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-3 содержит непрерывную последовательность из VEGFR-3 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-3 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области из VEGFR-3 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, часть внеклеточной области VEGFR-3 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична непрерывной последовательности из VEGFR-3 человека дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF содержит домен Fc. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, домен Fc представляет собой домен Fc IgG1. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, домен Fc IgG1 представляет собой домен Fc IgG1 человека дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, растворимый рецептор VEGF уменьшает способность VEGF связываться с одним или более из VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, вектор AAV дополнительно содержит последовательность секретиции.

Если не указано иное, "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает в себя все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность.

Термин "выделенный" означает измененный или удаленный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом существе, не являются выделенными, однако эта же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в естественном состоянии, будут выделенными. Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в чужеродной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

Термин "трансфицированный", "трансформированный", или "трансдуцированный" относится к процессу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку. "Трансфицированная", "трансформированная", или "трансдуцированная" клетка млекопитающего представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована с помощью экзогенной нуклеиновой кислоты.

Термин "экспрессия" относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок.

Термин "временная экспрессия" относится к экспрессии неинтегрированной кодирующей последовательности в течение короткого периода времени (например, часов или суток). Кодирующая последовательность, которая временно экспрессируется в клетке (например, клетке млекопитающего), теряется при множественных циклах клеточного деления.

Термин "субъект" предназначен для обозначения любого млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой грызуна (например, крысу или мышь), кролика, овцу, козу, свинью, собаку, кошку, примата, не являющегося человеком, или человека. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или имеет риск развития несиндромальной глухоты. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее был идентифицирован как имеющий расстройство внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления субъекту ранее был поставлен диагноз расстройство внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления субъект был идентифицирован как имеющий вызванную лекарственным средством потерю слуха. В некоторых вариантах осуществления субъект является младенцем (например, младенцем-человеком).

Лечение является "терапевтически эффективным", когда оно приводит к снижению одного или более из числа, тяжести и частоты одного или нескольких симптомов заболевания (например, бессимптомной нейросенсорной тугоухости) у субъекта (например, человека).

Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) или рибонуклеиновой кислоте (РНК) или их комбинации в одно- или двухцепочечной форме. При отсутствии специальных ограничений данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, обладающие свойствами связывания, аналогичными свойствам эталонных нуклеотидов. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно включает комплементарные последовательности наравне с явно указанными последова-

тельностями. В некоторых вариантах осуществления любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

Термин "сигнальный пептид" относится к последовательности, присутствующей на N-конце образующегося секретируемого белка, но отсутствует во встречающемся в природе зрелом белке. "Сигнальный пептид" расщепляется протеазой (например, сигнальной пептидазой) после трансляции сигнального пептида. Сигнальные пептиды известны в данной области техники. Неограничивающие примеры сигнальных пептидов включают: MEFFKKTALAALVMGFSGAALA (SEQ ID NO: 9) и MKYLLP-TAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO: 10).

Термин "расстройство внутреннего уха" относится к расстройству, вызванному неправильной работой клеток (например, волосковых клеток, опорных клеток, нейронов спирального ганглия, макрофагов или клеток Шванна) во внутреннем ухе или вокруг него. Неограничивающие примеры нарушений внутреннего уха включают, например, нейросенсорную потерю слуха (SNHL), вызванную шумом потерю слуха, вызванную лекарственными средствами потерю слуха, связанную с возрастом потерю слуха, акустическую невротому, нейрофиброматоз 2-го типа, слуховую невротому, вызванную шумом кохлеарную синаптопатию без потери волосковых клеток, возрастную улитковую синаптопатию, приобретенную нейросенсорную тугоухость и вестибулярную шванному. См., например, Kujawa et al., *Hear Res* 330(0 0): 191-199, 2015 и Suzuki et al., *Scientific Reports* 6: 24907. Неограничивающие примеры нарушений внутреннего уха описаны в данном документе, а дополнительные примеры нарушений внутреннего уха известны в данной области техники.

Термин "антитело" означает комплекс из двух или более отдельных полипептидных цепей, которые взаимодействуют с образованием по меньшей мере одного антигенсвязывающего домена. Неограничивающие примеры антител включают моноклональные антитела (например, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), поликлональные антитела, поливалентные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические, триспецифические и т.д. антитела, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность). Антитело может быть человеческим, гуманизированным и/или аффинно-зрелым.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент антитела" представляет собой единственный полипептид, который содержит все аминокислоты, которые составляют по меньшей мере один антигенсвязывающий домен (например, scFv).

Термин "моноклональное антитело" в данном документе относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени однородных антител, то есть отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением мутаций, происходящих по естественным причинам, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и направлены против одного антигена. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене.

Моноклональные антитела в данном документе включают "химерные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител конкретного вида животных или антител, принадлежащих к конкретному классу или подклассу, в то время как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител другого вида животных или антител, принадлежащих к другому классу или подклассу, а также фрагментам таких антител, при условии, что они демонстрируют желательную биологическую активность (см., например, патент США № 4816567 и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855(1984)).

"Антигенсвязывающий домен" представляет собой один или более белковых доменов (например, образованных из аминокислот из одного полипептида или образованных из аминокислот из двух или более полипептидов (например, одинаковых или разных полипептидов), которые способны специфически связываться с одним или более различными антигенами. В некоторых примерах антигенсвязывающий домен может связываться с антигеном или эпитопом со специфичностью и аффинностью, сходными с таковыми у встречающихся в природе антител. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен может содержать альтернативный каркас. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих доменов описаны в данном документе. Дополнительные примеры антигенсвязывающих доменов известны в данной области техники. В некоторых примерах антигенсвязывающий домен может связываться с одним антигеном.

"Аффинность" относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между антигенсвязывающим сайтом и его партнером по связыванию (например, антигеном или эпитопом). Если не указано иное, используемый в данном документе термин "аффинность" относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами антигенсвязывающего домена и антигеном или эпитопом. Аффинность молекулы X к ее партнеру Y может быть представлена константой равновесия при диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена обычными способами, известными в данной области техники, включая описанные в данном документе. Аффинность может быть определена,

например, с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (например, BIACORE®) или биослойной интерферометрии (например, FORTEBIO®). Дополнительные способы определения аффинности между антигенсвязывающим доменом и его соответствующим антигеном или эпитопом известны в данной области техники.

Термин "период полужизни" относится к периоду полужизни антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или растворимого рецептора VEGF в кровообращении (например, крови) млекопитающего (например, любого из млекопитающих, описанных в данном документе) и представлен временем, необходимым для выведения из кровообращения 50% антитела, его фрагмента антигенсвязывающего антитела или растворимого рецептора VEGF. В некоторых вариантах осуществления изменение периода полужизни (например, уменьшение периода полужизни антитела, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или растворимого рецептора VEGF) определяют путем сравнения периода полужизни антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела или растворимого рецептора VEGF у субъекта с периодом полужизни контрольного антитела, контрольного антигенсвязывающего фрагмента антитела или контрольного растворимого рецептора VEGF у аналогичного млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления период полужизни антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или растворимого рецептора VEGF у млекопитающего определяют путем измерения уровня антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или растворимого рецептора VEGF в полученных образцах, от субъекта (например, образца крови) в различные моменты времени после системного введения (например, внутривенного) введения любого из векторов AAV, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления уровень антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или растворимого рецептора VEGF, присутствующего в образцах, полученных от млекопитающего, определяют с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) или другого анализа, известного в данной области техники, и определяют уровень антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или растворимого рецептора VEGF, присутствующего в образцах, наносят на график как функцию времени с использованием программы (например, GraphPad Prism).

Термин "активность VEGF" относится к одной или более известным активностям белка VEGF. Например, одной активностью белка VEGF является способность связываться с одним или более рецепторами VEGF. В другом примере одной активностью белка VEGF является способность VEGF запускать нисходящей путь (пути) передачи сигнала в клетке млекопитающего, экспрессирующей рецептор VEGF. Способы обнаружения одной или более активностей VEGF известны в данной области техники.

Термин "растворимый рецептор VEGF" относится к полипептиду, который содержит часть внеклеточной области одного или более рецептора(ов) VEGF млекопитающих (например, VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3), функционально связанных с сигнальным пептидом, причем растворимый рецептор VEGF способен специфически связываться с одним или более белками VEGF млекопитающих (например, одним или более из VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D). В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области VEGFR-1 (например, смежную последовательность из VEGFR-1 человека дикого типа (например, один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-1 человека дикого типа) или последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична смежной последовательности из VEGFR-1 человека дикого типа). В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области VEGFR-2 (например, смежную последовательность из VEGFR-2 человека дикого типа (например, один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-2 человека дикого типа) или последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична смежной последовательности из VEGFR-2 человека дикого типа). В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области VEGFR-1 и часть внеклеточной области VEGFR-2 (например, один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-1 человека дикого типа и один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области из VEGFR-2 человека дикого типа) (например, афлиберцепт). В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области VEGFR-3 (например, смежную последовательность из VEGFR-3 человека дикого типа (например, один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-3 человека дикого типа) или последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична смежной последовательности из VEGFR-3 человека дикого типа).

В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF может дополнительно содержать стабилизирующий домен (например, домен Fc, такой как домен Fc IgG1 (например, домен Fc IgG1 человека дикого типа)). В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF уменьшает способность VEGF связываться с одним или более (например, двумя или тремя) из VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют те же значения, которые обычно понимает средний специалист в данной области техники, к которой относится это изобретение. В данном документе описаны способы и материалы для использования в настоящем изобретении; могут быть также использованы другие подходящие способы и материалы, известные в данной области. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не имеют ограничительного характера. Все публикации, патентные заявки, патенты, последовательности, записи в базах данных и

другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены в полном объеме посредством ссылки. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А представляет собой иллюстративный вектор AAV длиной 4474 п.н., который содержит последовательность, кодирующую бевацизумаб (Avastin®).

Фиг. 1В представляет собой иллюстративный вектор AAV длиной 3814 п.н., который содержит последовательность, кодирующую ранибизумаб (Lucentis®).

Фиг. 1С представляет собой иллюстративный вектор AAV длиной 4573 п.н., который содержит последовательность, кодирующую ранибизумаб и зеленый флуоресцентный белок (GFP).

Фиг. 1D представляет собой иллюстративный вектор AAV длиной 3631 п.н., который содержит последовательность, кодирующую афлиберцепт (Eylea®).

Фиг. 2 представляет собой вестерн-блоттинг, демонстрирующий экспрессию в клетках НЕК различных антител против VEGF или фрагментов антигенсвязывающих антител или растворимых рецепторов VEGF с использованием иллюстративных векторов AAV, описанных в данном документе. Дорожка 1: предварительно окрашенный набор маркерных белков PageRuler™. Дорожка 2: нетрансфицированный/отрицательный контроль. Дорожка 3: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1А. Дорожка 4: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1С. Дорожка 5: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1В. Дорожка 6: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1А, с множественностью заражения (МОГ), равной $7,5 \times 10^4$. Дорожка 7: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1А, с МОИ, равной $2,2 \times 10^5$. Дорожка 8: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1А, с МОИ, равной $5,5 \times 10^5$. Дорожка 9: предварительно окрашенный набор маркерных белков PageRuler™. Дорожка 10: нетрансфицированный/отрицательный контроль. Дорожка 11: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1А. Дорожка 12: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1С. Дорожка 13: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1В. Дорожка 14: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1А, с множественностью заражения (МОГ), равной $7,5 \times 10^4$. Дорожка 15: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1А, с МОИ, равной $2,2 \times 10^5$. Дорожка 16: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1А, с МОИ, равной $5,5 \times 10^5$. Дорожки 2-8 содержат восстановленные белки. Дорожки 10-16 содержат невосстановленные белки.

Фиг. 3А представляет собой график, демонстрирующий аффинность контрольного моноклонального антитела мыши против VEGF человека (MmAb против hVEGF) в буфере с использованием рекомбинантного VEGF человека в качестве связывающего агента, что измерено биосенсорным инструментом Octet® HTX с использованием программного обеспечения для анализа Octet®. Data Analysis HT10.0.

Фиг. 3В представляет собой график, демонстрирующий сродство контрольного MmAb против hVEGF в образцах кондиционированной среды (СМ) с использованием рекомбинантного VEGF человека в качестве связывающего агента, что измерено биосенсорным инструментом Octet® HTX с использованием программного обеспечения для анализа Octet®, Data Analysis HT10.0. *: MmAb против hVEGF готовили в СМ при 100 мкг/мл, затем разбавляли до конечной концентрации 10 мкг/мл в 1х кинетическом буфере.

Фиг. 4А представляет собой график, демонстрирующий аффинность кондиционированной среды с использованием рекомбинантного VEGF человека в качестве связывающего агента, что измерено биосенсорным инструментом Octet® HTX с использованием программного обеспечения для анализа Octet®, Data Analysis HT10.0.

Фиг. 4В представляет собой график, демонстрирующий аффинность культуральной среды от клеток НЕК, трансфицированных вектором AAV, представленным на фиг. 1А, с использованием рекомбинантного VEGF человека в качестве связывающего агента с использованием биосенсорного инструмента Octet® HTX с использованием программного обеспечения для анализа Octet®, Data Analysis HT10.0.

Фиг. 4С представляет собой таблицу, демонстрирующую константу равновесной диссоциации (K_D) определяемую из данных, показанных на фиг. 3А, 3В, 4А и 4В (идуших сверху вниз в таблице).

Подробное описание сущности изобретения

В данном документе предложены способы, которые включают введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора аденоассоциированного вируса (AAV), который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую (а) полипептид, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом и полипептид, содержащий переменный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом или (б) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, Fab или scFv), функционально связанный с сигнальным пептидом.

В данном документе также предложены способы повышения уровня антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела во внутреннем ухе нуждающегося в этом млекопитающего, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую (а) полипептид, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий переменный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигналь-

приводит к лечению акустической невралгии, вестибулярной шванномы или нейрофиброматоза 2-го типа, соответственно, во внутреннем ухе млекопитающего.

Также предложены наборы, которые содержат любой из векторов AAV, описанных в данном документе.

Дополнительные неограничивающие аспекты композиций, наборов и способов описаны в данном документе и могут быть использованы в любой комбинации без ограничения.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител.

В некоторых вариантах осуществления антитело может представлять собой гуманизированное антитело, химерное антитело или поливалентное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела могут представлять собой scFv-Fc, домен V_HH, домен V_{NAR}, (scFv)₂, минитело или BiTE. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела могут представлять собой DVD-Ig, и перенаправляющее антитело с двойной аффинностью (DART), триомаб, kih IgG с общим LC, crossmab, орто-Fab IgG, 2-в-1-IgG, IgG-ScFv, scFv2-Fc, би-нанотело, антитело tandem, DART-Fc, scFv-HAS-scFv, DNL-Fab3, DAF (два в одном или четыре в одном), DutaMab, DT-IgG, общие LC "выступы во впадины" (knobs-in-holes), сборки "выступы во впадины", заряженные пары антител, антитела с обменом Fab-плеч, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y, Fcab, κL-тела, ортогональный Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)-IgG, IgG (L, H)-Fc, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, kih IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zyboby, DVI-IgG, нанотело, нанотело-ЧСА, диатело, TandAb, оцдиатело, оцдиатело-CH3, диатело-CH3, триатело, миниантитело, минитело, минитело TriBi, scFv-CH3 kih, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')₂-scFv₂, scFv-kih, Fab-scFv-Fc, четырехвалентное HCAb, оцдиатело-Fc, диатело-Fc, тандем scFv-Fc, интратело, биспецифичное антитело "dock and lock", ImmTAC, HSAbody, оцдиатело-HAS, тандем scFv, IgG-IgG, Cov-X-Body и scFv1-PEG-scFv2.

Дополнительные примеры антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела включают фрагмент Fv, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂ и фрагмент Fab'. Дополнительные примеры антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела включают антигенсвязывающий фрагмент IgG (например, антигенсвязывающий фрагмент IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) (например, антигенсвязывающий фрагмент человеческого или гуманизированного IgG, например, человеческого или гуманизированного IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4); антигенсвязывающий фрагмент IgA (например, антигенсвязывающий фрагмент IgA1 или IgA2) (например, антигенсвязывающий фрагмент человеческого или гуманизированного IgA, например, человеческого или гуманизированного IgA1 или IgA2); антигенсвязывающий фрагмент IgD (например, антигенсвязывающий фрагмент человеческого или гуманизированного IgD); антигенсвязывающий фрагмент IgE (например, антигенсвязывающий фрагмент человеческого или гуманизированного IgE) или антигенсвязывающий фрагмент IgM (например, антигенсвязывающий фрагмент человеческого или гуманизированного IgM).

Любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов антитела, описанных в данном документе, может специфически связываться с VEGF.

Домен V_HH представляет собой единственный мономерный вариабельный домен антитела, который можно найти у верблюжьих. Домен V_{NA1} представляет собой единственный мономерный вариабельный домен антитела, который можно найти у хрящевых рыб. Неограничивающие аспекты доменов V_HH и доменов V_{NAR} описаны, например, в Cromie et al., *Curr. Top. Med. Chem.* 15:2543-2557, 2016; De Genst et al., *Dev. Comp. Immunol.* 30:187-198, 2006; De Meyer et al., *Trends Biotechnol.* 32:263-270, 2014; Kijanka et al., *Nanomedicine* 10:161-174, 2015; Kovaleva et al., *Expert. Opin. Biol. Ther.* 14:1527-1539, 2014; Krahl et al., *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 38:21-28, 2016; Mujic-Delic et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 35:247-255, 2014; Muylldermans, J. *Biotechnol.* 74:277-302, 2001; Muylldermans et al., *Trends Biochem. Sci.* 26:230-235, 2001; Muylldermans, *Ann. Rev. Biochem.* 82:775-797, 2013; Rahbarizadeh et al., *Immunol. Invest.* 40:299-338, 2011; Van Audenhove et al., *EBioMedicine* 8:40-48, 2016; Van Bockstaele et al., *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10:1212-1224, 2009; Vincke et al., *Methods Mol. Biol.* 911:15-26, 2012 и Wesolowski et al., *Med. Microbiol. Immunol.* 198:157-174, 2009.

Фрагмент "Fv" содержит нековалентно связанный димер одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи.

Фрагмент "Fab" содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи, в дополнение к вариабельным доменам тяжелой и легкой цепи фрагмента Fv.

Фрагмент "F(ab')₂" содержит два фрагмента Fab, соединенных около шарнирной области дисульфидными связями.

Термин "иммуноглобулин с двумя вариабельными доменами" или "DVD-Ig" относится к мультивалентным и полиспецифичным связывающим белкам, как описано, например, в DiGiammarino et al., *Methods Mol. Biol.* 899:145-156, 2012; Jakob et al., *MABs* 5:358-363, 2013 и патентах США № 7612181; 8258268; 8586714; 8716450; 8722855; 8735546 и 8822645, каждый из которых включен в качестве ссылки в полном объеме.

DART описаны, например, в Garber, *Nature Reviews Drug Discovery* 13:799-801, 2014.

Дополнительные аспекты антител и антигенсвязывающих фрагментов антител известны в данной

области техники.

В некоторых вариантах осуществления любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов антитела, описанных в данном документе, имеет константу диссоциации (K_D) менее чем 1×10^{-5} М (например, менее чем $0,5 \times 10^{-5}$ М, менее чем 1×10^{-6} М, менее чем $0,5 \times 10^{-6}$ М, менее чем 1×10^{-7} М, менее чем $0,5 \times 10^{-7}$ М, менее чем 1×10^{-8} М, менее чем $0,5 \times 10^{-8}$ М, менее чем 1×10^{-9} М, менее чем $0,5 \times 10^{-9}$ М, менее чем 1×10^{-10} М, менее чем $0,5 \times 10^{-10}$ М, менее чем 1×10^{-11} М, менее чем $0,5 \times 10^{-11}$ М или менее чем 1×10^{-12} М), например, как измерено в физиологическом растворе с фосфатным буфером с использованием поверхностного плазмонного резонанса (ППР) для белка VEGF (например, любого из белков VEGF, описанных в данном документе, например, одного или более из зрелого VEGF-A человека, зрелого VEGF-B человека, зрелого VEGF-C человека и зрелого VEGF-D человека).

В некоторых вариантах осуществления любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов антитела, описанных в данном документе, имеет K_D , равную около 1×10^{-12} М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, около 1×10^{-7} М, около $0,5 \times 10^{-7}$ М, около 1×10^{-8} М, около $0,5 \times 10^{-8}$ М, около 1×10^{-9} М, около $0,5 \times 10^{-9}$ М, около 1×10^{-10} М, около $0,5 \times 10^{-10}$ М, около 1×10^{-11} М или около $0,5 \times 10^{-11}$ М (включительно); около $0,5 \times 10^{-11}$ М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, около 1×10^{-7} М, около $0,5 \times 10^{-7}$ М, около 1×10^{-8} М, около $0,5 \times 10^{-8}$ М, около 1×10^{-9} М, около $0,5 \times 10^{-9}$ М, около 1×10^{-10} М, около $0,5 \times 10^{-10}$ М, или около 1×10^{-11} М (включительно); около 1×10^{-11} М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, около 1×10^{-7} М, около $0,5 \times 10^{-7}$ М, около 1×10^{-8} М, около $0,5 \times 10^{-8}$ М, около 1×10^{-9} М, около $0,5 \times 10^{-9}$ М, около 1×10^{-10} М или около $0,5 \times 10^{-10}$ М (включительно); около $0,5 \times 10^{-10}$ М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, около 1×10^{-7} М, около $0,5 \times 10^{-7}$ М, около 1×10^{-8} М, около $0,5 \times 10^{-8}$ М, около 1×10^{-9} М, около $0,5 \times 10^{-9}$ М или около 1×10^{-10} М (включительно); около 1×10^{-10} М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, около 1×10^{-7} М, около $0,5 \times 10^{-7}$ М, около 1×10^{-8} М, около $0,5 \times 10^{-8}$ М, около 1×10^{-9} М или около $0,5 \times 10^{-9}$ М (включительно); около $0,5 \times 10^{-9}$ М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, около 1×10^{-7} М, около $0,5 \times 10^{-7}$ М, около 1×10^{-8} М, около $0,5 \times 10^{-8}$ М, или около 1×10^{-9} М (включительно); около 1×10^{-9} М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, около 1×10^{-7} М, около $0,5 \times 10^{-7}$ М, около 1×10^{-8} М, около $0,5 \times 10^{-8}$ М, или около 1×10^{-9} М (включительно); около $0,5 \times 10^{-8}$ М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, около 1×10^{-7} М, около $0,5 \times 10^{-7}$ М, или около 1×10^{-8} М (включительно); около 1×10^{-8} М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, около 1×10^{-7} М, или около $0,5 \times 10^{-7}$ М (включительно); около $0,5 \times 10^{-7}$ М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, или около 1×10^{-7} М (включительно); около 1×10^{-7} М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, или около $0,5 \times 10^{-6}$ М (включительно); около $0,5 \times 10^{-6}$ М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, или около 1×10^{-6} М (включительно); около 1×10^{-6} М до около 1×10^{-5} М или около $0,5 \times 10^{-5}$ М (включительно); или около $0,5 \times 10^{-5}$ М до около 1×10^{-5} М (включительно), например, как измерено в физиологическом растворе с фосфатным буфером с использованием поверхностного плазмонного резонанса (ППР), для белка VEGF (например, любого из белков VEGF, описанных в данном документе, например, одного или более из зрелого VEGF-A человека, зрелого VEGF-B человека, зрелого VEGF-C человека и зрелого VEGF-D человека).

Для определения значений K_D любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов антител, описанных в данном документе может быть использованы различные методы, известные в данной области техники (например, анализ изменения электрофоретической подвижности, анализ связывания на фильтре, поверхностный плазмонный резонанс, и анализ кинетики биомолекулярного связывания и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления любого из антител и/или антигенсвязывающих фрагментов антител, описанных в данном документе, период полужизни антитела и/или антигенсвязывающего фрагмента антитела у субъекта (например, человека) уменьшается на от около 0,5-раз до около 4-раз (например, от около 0,5-раз до около 3,5-раз, от около 0,5-раз до около 3-раз, от около 0,5-раз до около 2,5-раз, от около 0,5-раз до около 2-раз, от около 0,5-раз до около 1,5-раз, от около 0,5-раз до около 1-раз, от около 1-раз до около 4-раз, от около 1-раз до около 3,5-раз, от около 1-раз до около 3-раз, от около 1-раз до около 2,5-раз, от около 1-раз до около 2-раз, от около 1,5-раз до около 4-раз, от около 1,5-раз до около 3,5-раз, от около 1,5-раз до около 2,5-раз, от около 1,5-раз до около 2-раз, от около 2-раз до около 4-раз, от около 2-раз до около 3,5-раз, от около 2-раз до около 3-раз, от около 2-раз до около 2,5-раз, от около 2,5-раз до около 4-раз, от около 2,5-раз до около 3,5-раз, от около 2,5-раз до около 3-раз, от около 3-раз до около 4-раз, от около 3-раз до около 3,5-раз или от около 3,5-раз до около 4-раз) по сравнению с периодом полужизни контрольного антитела и/или контрольного антигенсвязывающего фрагмента антитела (например, любого из контрольных антител и контрольных антигенсвязывающих фрагментов антител, описанных в данном документе) у аналогичного субъекта. См., например, Leabman et al., MAbs. 5(6): 896-903, 2013. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, описанные в данном документе, имеют одну или более аминокислотных замен в области Fc, которые уменьшают его период полужизни у млекопитающего, а контрольное антитело не имеет по меньшей мере одной (например, отсутствуют все) этих одной или более аминокислотных замен.

кислотных замен в области Fc.

VEGF.

Ген VEGF кодирует фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ранее известный как fms-подобная тирозинкиназа (Flt-1). Белок VEGF представляет собой гепарин-связывающий белок, который вызывает миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов.

Неограничивающие примеры белковых и нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок VEGF дикого типа, приведены ниже.

Последовательность варианта 1 транскрипта белка VEGF человека (SEQ ID NO: 1)

MTDRQTD TAPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALK
LFVQLLGC SRFGGAVVRAGEAEP SGAARSASSGREEPQPEEGEEEEKEEERGPQWRLG
ARKPGSWTGEAAVCADSAPAARAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRSAS
RAGPGRASET MNFLLSWVHWSLALLYLHNAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDV
YQRSYCHPIETLVDIFQEY PDEIEYIFKPCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIM
RIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKKGQKRKRKKSRYKSW
VYVGARCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNE
RTCRC DKPRR

кДНК варианта 1 транскрипта VEGF человека (SEQ ID NO: 2)

ct gacggacaga cagacagaca cgcgccccag ccccagctac cacctctcc cggccggcg gcgacagtg
gacgcggcg cgagccggc gcaggggccc gagcccgcgc ccggaggcgg ggtggagggg gtcggggctc
gcggcgtcgc actgaaactt ttctccaac ttctgggctg ttctccttc ggaggagccg tggcgcgc
gggggaagccgagccgagcg gagccgcgag aagtgtctagc tcgggccggg aggagccgca gccggaggag ggggaggagg
aagaagagaa ggaagaggag agggggcgc agtggcact cggcctcgg aagccgggct catggagggg taggcggcg
gtgtgcgac acagtctcc agccgcgcgc gctcccagg cctggcccg ggcctcgggc cggggaggaa gtagctcg
ccgagcgcg gaggagagc ggcggccca cagccgagc cggagaggga gcgcgagccg cccggcccc ggtcgggct
ccgaaacct gaactttctg ctgtctggg tgcattggag cctgcctgtctctacc tcaccatgc caagtgtcc caggctgac
ccatggcaga aggaggagg cagaatcacc acgaagtgt gaagtcatg gatgtctacc agcgcagcta ctgcatcca
atcgagacc tggtagacat ctccaggag tacctgatg agatcgagta catctcaag ccactctgtg tccccgat
gcatgaggg ggctctgca atgacgagg cctggagtgt gtcccactg aggagtcca catccatg cagattatg
ggatcaaac tcaccaaggc cagcatag gagagatgag ctctacag cacaacaaat gtgaatgcag accaaagaaa
gatagagcaa gacaagaaa aaaatcagtt cgaggaaagg gaaaggggca aaaacgaaag cgcaagaaat cccggataa
gtcctggagc gtgtacgtg gtgcccgtg ctgtctaatg ccctggagcc tcctggccc ccactcctgt gggcctgtg
cagagcggag aaagcattg tttgtacaag atccgcagac gtgtaaatgt tcctgcaaaa acacagactc gcgttgcaag
gcgaggcagc ttgagttaa cgaacgtact tgcagatgtg acaagccgag gcggtga

Последовательность варианта 3 транскрипта белка VEGF человека (SEQ ID NO: 3)

MTDRQTD TAPSPSYHLLPGRRRRTVDAAASRGQPEPAPGGGVEGVGARGVALK
 LFVQLLGCSRFGGAVVRAGEAEPGAARSASSGREEPQPEEGEEEEKEEERGPQWRLG
 ARKPGSWTGEAAVCADSAPAARAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGSAS
 RAGPGRASET MNFLLSVHWSLALLLYLHHA KWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDV
 YQRSYCHPIETLVDIFQEY PDEIEYIFK PSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPT EESNITMQIM
 RIKPHQGQHIGEMSFLQH NKCECRPKKDRARQEKKSVRGKKGQKRKRKKS RPCGPCS
 ERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

кДНК варианта 3 транскрипта VEGF человека (SEQ ID NO: 4)

ct gacggacaga cagacagaca cgcggccag cccagctac cacctctcc cggccggcg gcgacagtg
 gacgcccgg cgagccggc gcagggccg gagccgcgc ccggaggcgg ggtggagggg gtcggggctc
 gcgcgctgc actgaaactt ttcgtcaac ttctggctg ttctcctc ggaggagccg tggccgcgc
 gggggaagccgagccgagcg gagccgcgag aagtgtcagc tcggggccgg aggagccgca gccggaggag ggggaggagg
 aagaagagaa ggaagaggag agggggccgc agtggcact cggcctcgg aagccggct catggagcgg tagggcgcg
 gtgtgcgac acagtctcc agccgcgcgc gctccccagg cctggcccgg ggcctcgggc cggggaggaa gagtagctc
 ccgagggcgc gaggagagcg ggcggccca cagccgagc cggagaggga gcgcgagccg cggcggccc gtcggggct
 ccgaaacct gaacttctg ctgtctggg tgcattggag ccttgccttgcctctacc tcaccatgc caagtgtcc caggtgcac
 ccatggcaga aggaggagg cagaatcac acgaagtgt gaagtcatg gatgtctac agcgagccta ctgccatca
 atcgagacc tggggacat cttccaggag tacctgatg agatcgagta catctcaag ccatcctgtg tggcctgat
 gcgatcggg ggtcctgca atgacaggc cctggagtgt gtcccactg aggagtcca catccatg cagattatgc
 ggatcaaacc tcaccaagg cagcatag gagagatgag cttctacag cacaacaat gtgaatcgac accaagaaa
 gatagagcaa gacaagaaa aaaatcagt cgaggaaagg gaaaggggca aaaacgaaag cgcaagaaat cccgtccctg
 tggccctgc tcagagcga gaaagcatt gttgtaca gatccgcaga cgtgtaaat ttctgcaaa aacacagact
 cgcgttgcaa ggcgagcag cttgagtaa acgaactac ttgcagatg gacaagcca ggcggtga

Зрелый VEGF-A человека (SEQ ID NO: 13)

арма еgggqnhhev vkfmdvyqrs ychpietlvd ifqeypdeie yifkpscpl mrcggccnde glecvptes
 nitmqimrik phqqhigem sflqhnkcec rpkkdrarqe kksvrgkkg qkrkrkksry kswsvyvgar cclmpwslpg
 phpcgpeser rkhlfvqdpq tckcckntd srckarqlel nertercdk rr

Зрелый VEGF-B человека (SEQ ID NO: 14)

pvsqpdapg hqrkvswid vytratcpr evvplvtel mgtvakqlvp scvtvqrcgg ccpddglecv
 ptgqhqvrmq ilmrypssq lgemsleehs qcscrpkkd savkpdraat phhrpqrsv pgwdsapgap spadithptp
 apgsahaap sttsaltppg aaaaadaaas svakgga

Зрелый VEGF-C человека (SEQ ID NO: 15)

Ahynteilk sidnewrtq cmprevcidv gkefvatnt ffpccvsvy rcggcncseg lqcmntstsy
 lsktifeitv plsqgpkpvt isfanhtscr cmskldvyrq vhsiir

Зрелый VEGF-D человека (SEQ ID NO: 16)

fa atfydietlk videewqrtq cspretcevev aselgkstnt ffpccvsvf reggccnees licmntstsy
 iskqlfeisv pltsvpelvp vkvanhtgck clptaphpy siir

В некоторых примерах любого из антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в дан-
 ном документе, антитело и антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с антигеном VEGF (на-
 пример, с любым из иллюстративных белков VEGF, описанных в данном документе, например, с одним
 или более из зрелого VEGF-A человека, зрелого VEGF-B человека, зрелого VEGF-C человека и зрелого
 VEGF-D человека) (например, любая из аффинностей связывания, описанных в данном документе). В
 некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, антитело или антигенсвязываю-
 щий фрагмент антитела могут снижать активность VEGF (например, одного или более из любого из ил-
 люстративных белков VEGF, описанных в данном документе, например, одного или более из зрелого
 VEGF-A человека, зрелого VEGF-B человека, зрелого VEGF-C человека и зрелого VEGF-D человека). В
 некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела могут бло-
 кировать VEGF (например, один или более из любого из иллюстративных белков VEGF, описанных в
 данном документе, например, одного или более из зрелого VEGF-A человека, зрелого VEGF-B человека,
 зрелого VEGF-C человека и зрелого VEGF-D человека) от связывания с одним или более его рецептора-

ми (например, одним или более рецепторами VEGF). См., например, WO 1998/045331, US 9079953, US 2015/0147317, US 2016/0289314, Plotkin et al., *Otology & Neurotology* 33: 1046-1052 (2012) и Ferrara et al. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* 333(2): 328-335. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела могут уменьшать нисходящий путь сигналов (например, нисходящий путь сигналов от рецептора VEGF, например, одного или более из любых иллюстративных рецепторов VEGF, описанных в данном документе, например, одного или более из VEGFR-1 человека, VEGFR-2 человека и VEGFR-3 человека). В некоторых вариантах осуществления снижение активности VEGF может быть обнаружено косвенно, например, посредством повышения слуха (например, увеличение от 1% до около 400% (или любого из поддиапазонов этого диапазона, описанных в данном документе) или уменьшения (например, уменьшения от 1 до 99%, от 1 до 95%, от 1 до 90%, от 1 до 85%, от 1 до 80%, от 1 до 75%, от 1 до 70%, от 1 до 65%, от 1 до 60%, от 1 до 55%, от 1 до 50%, от 1 до 45%, от 1 до 40%, от 1 до 35%, от 1 до 30%, от 1 до 25%, от 1 до 20%, от 1 до 15%, от 1 до 10%, от 1 до 5%, от 5 до 99%, от 5 до 95%, от 5 до 90%, от 5 до 85%, от 5 до 80%, от 5 до 75%, от 5 до 70%, от 5 до 65%, от 5 до 60%, от 5 до 55%, от 5 до 50%, от 5 до 45%, от 5 до 40%, от 5 до 35%, от 5 до 30%, от 5 до 25%, от 5 до 20%, от 5 до 15%, от 5 до 10%, от 10 до 99%, от 10 до 95%, от 10 до 90%, от 10 до 85%, от 10 до 80%, от 10 до 75%, от 10 до 70%, от 10 до 65%, от 10 до 60%, от 10 до 55%, от 10 до 50%, от 10 до 45%, от 10 до 40%, от 10 до 35%, от 10 до 30%, от 10 до 25%, от 10 до 20%, от 10 до 15%, от 15 до 99%, от 15 до 95%, от 15 до 90%, от 15 до 85%, от 15 до 80%, от 15 до 75%, от 15 до 70%, от 15 до 65%, от 15 до 60%, от 15 до 55%, от 15 до 50%, от 15 до 45%, от 15 до 40%, от 15 до 35%, от 15 до 30%, от 15 до 25%, от 15 до 20%, от 20 до 99%, от 20 до 95%, от 20 до 90%, от 20 до 85%, от 20 до 80%, от 20 до 75%, от 20 до 70%, от 20 до 65%, от 20 до 60%, от 20 до 55%, от 20 до 50%, от 20 до 45%, от 20 до 40%, от 20 до 35%, от 20 до 30%, от 20 до 25%, от 25 до 99%, от 25 до 95%, от 25 до 90%, от 25 до 85%, от 25 до 80%, от 25 до 75%, от 25 до 70%, от 25 до 65%, от 25 до 60%, от 25 до 55%, от 25 до 50%, от 25 до 45%, от 25 до 40%, от 25 до 35%, от 25 до 30%, от 30 до 99%, от 30 до 95%, от 30 до 90%, от 30 до 85%, от 30 до 80%, от 30 до 75%, от 30 до 70%, от 30 до 65%, от 30 до 60%, от 30 до 55%, от 30 до 50%, от 30 до 45%, от 30 до 40%, от 30 до 35%, от 35 до 99%, от 35 до 95%, от 35 до 90%, от 35 до 85%, от 35 до 80%, от 35 до 75%, от 35 до 70%, от 35 до 65%, от 35 до 60%, от 35 до 55%, от 35 до 50%, от 35 до 45%, от 35 до 40%, от 40 до 99%, от 40 до 95%, от 40 до 90%, от 40 до 85%, от 40 до 80%, от 40 до 75%, от 40 до 70%, от 40 до 65%, от 40 до 60%, от 40 до 55%, от 40 до 50%, от 40 до 45%, от 45 до 99%, от 45 до 95%, от 45 до 90%, от 45 до 85%, от 45 до 80%, от 45 до 75%, от 45 до 70%, от 45 до 65%, от 45 до 60%, от 45 до 55%, от 45 до 50%, от 50 до 99%, от 50 до 95%, от 50 до 90%, от 50 до 85%, от 50 до 80%, от 50 до 75%, от 50 до 70%, от 50 до 65%, от 50 до 60%, от 50 до 55%, от 55 до 99%, от 55 до 95%, от 55 до 90%, от 55 до 85%, от 55 до 80%, от 55 до 75%, от 55 до 70%, от 55 до 65%, от 55 до 60%, от 60 до 99%, от 60 до 95%, от 60 до 90%, от 60 до 85%, от 60 до 80%, от 60 до 75%, от 60 до 70%, от 60 до 65%, от 65 до 99%, от 65 до 95%, от 65 до 90%, от 65 до 85%, от 65 до 80%, от 65 до 75%, от 65 до 70%, от 70 до 99%, от 70 до 95%, от 70 до 90%, от 70 до 85%, от 70 до 80%, от 70 до 75%, от 75 до 99%, от 75 до 95%, от 75 до 90%, от 75 до 85%, от 75 до 80%, от 80 до 99%, от 80 до 95%, от 80 до 90%, от 80 до 85%, от 85 до 99%, от 85 до 95%, от 85 до 90%, от 90 до 99%, от 90 до 95% или от 95 до 99%) в размере или тяжести одного или более симптомов акустической невномы, вестибулярной шванномы или нейрофиброматоза II типа у млекопитающего по сравнению с уровнем слуха или размером акустической невномы, вестибулярной шванномы или нейрофиброматоза II типа у млекопитающего, соответственно, перед введением любого из векторов AAV, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления снижение активности VEGF можно обнаружить в анализе *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с VEGF, представляет собой бевацизумаб (Avastatin®) или его антигенсвязывающий фрагмент. Бевацизумаб (полноразмерное антитело ~ 150 кДа) ингибирует все изоформы VEGF-A. Бевацизумаб получил одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) в 2004 году в отношении рака толстой кишки для внутривенной (в/в) дозы 4,0-7,5 мг/кг через 2-3 недели (период полужизни в плазме 21 сутки), для внутриветриальной (в/а) дозы 1,25 мг в 0,05 мл (период полужизни составляет 5,6 суток). Бевацизумаб имеет K_D к VEGF 165 (VEGF-A), равную 58 пМ. См., например, WO 2017/050825. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с VEGF, представляет собой ранибизумаб (Lucentis®) или его антигенсвязывающий фрагмент. Ранибизумаб (~ 50 кДа) ингибирует все изоформы VEGF-A. Ранибизумаб получил одобрение FDA в 2006 году в отношении глазного применения для внутривенной (в/в) дозы 4,0-7,5 мг/кг через 2-3 недели (период полужизни в плазме 0,5 сутки), для внутриветриальной (в/а) дозы 0,5 мг в 0,05 мл (период полужизни составляет 3,2 суток). Ранибизумаб имеет K_D к VEGF 165 (VEGF-A) равную 46 пМ. См., например, WO 2014/178078. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с VEGF, представляет собой севацизумаб (APX003/SIM-BD0801) или его антигенсвязывающий фрагмент.

Аминокислотная последовательность легкой цепи бевацизумаба (SEQ ID NO:

5)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHS
 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 SLTTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи бевацизумаба (SEQ ID NO: 6)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGVIN
 TYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYFD
 VWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPR
 EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

В некоторых вариантах осуществления антител, которые специфически связываются с VEGF и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельный домен легкой цепи, который представляет собой или содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична вариабельному домену легкой цепи бевацизумаба и/или содержит вариабельный домен тяжелой цепи, который представляет собой или содержит последовательность, которая представляет собой по меньшей мере 80% идентична (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична вариабельному домену тяжелой цепи бевацизумаба.

В некоторых вариантах осуществления антител, которые специфически связываются с VEGF и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельный домен легкой цепи, который представляет собой или содержит вариабельный домен легкой цепи бевацизумаба, и/или вариабельный домен тяжелой цепи, который представляет собой или содержит вариабельный домен тяжелой цепи бевацизумаба. В некоторых вариантах осуществления антител, которые специфически связываются с VEGF и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельный домен легкой цепи, который представляет собой последовательность вариабельного домена легкой цепи бевацизумаба или содержит последовательность, за исключением того, что он содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен и/или содержит вариабельный домен тяжелой цепи, который представляет собой или содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи бевацизумаба, за исключением того, что она содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит три CDR в вариабельном домене легкой цепи бевацизумаба и/или три CDR в вариабельном домене тяжелой цепи бевацизумаба.

Аминокислотная последовательность легкой цепи ранибизумаба (SEQ ID NO:

7)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYQCQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEFI
 FPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи ранибизумаба (SEQ ID NO: 8)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGVIN
 TYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYF
 DVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HL

В некоторых вариантах осуществления антител, которые специфически связываются с VEGF и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельный домен легкой цепи, который представляет собой или содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична вариабельному домену легкой цепи ранибизумаба и/или содержит вариабельный домен тяжелой цепи, который представляет собой или содержит последовательность, которая представляет собой по меньшей мере 80% идентична (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична вариабельному домену тяжелой цепи ранибизумаба.

В некоторых вариантах осуществления антител, которые специфически связываются с VEGF и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельный домен легкой цепи, который представляет собой или содержит вариабельный домен легкой цепи ранибизумаба, и/или вариабельный домен тяжелой цепи, который представляет собой или содержит вариабельный домен тяжелой цепи ранибизумаба. В некоторых вариантах осуществления антител, которые специфически связываются с VEGF и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельный домен легкой цепи, который представляет собой последовательность вариабельного домена легкой цепи ранибизумаба или содержит последовательность, за исключением того, что он содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен и/или содержит вариабельный домен тяжелой цепи, который представляет собой или содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи ранибизумаба, за исключением того, что она содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит три CDR в вариабельном домене легкой цепи ранибизумаба и/или три CDR в вариабельном домене тяжелой цепи ранибизумаба.

Растворимые рецепторы VEGF.

Растворимый рецептор VEGF представляет собой полипептид, который содержит часть внеклеточной области одного или более (например, двух или трех) рецепторов VEGF млекопитающих (например, одного или более из VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3) функционально связанную с сигнальным пептидом (например, любым из иллюстративных сигнальных пептидов, описанных в данном документе), причем растворимый рецептор VEGF способен специфически связываться с одним или более белками VEGF млекопитающих (например, одним или более (например, двумя, тремя или четырьмя) из VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D, например, одним или более (например, двумя, тремя или четырьмя) из VEGF-A человека дикого типа, VEGF-B человека дикого типа, VEGF-C человека дикого типа и VEGF-D человека дикого типа).

В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF содержит часть (например, от около 10 аминокислот до около 732 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 400 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 350 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 300 аминокислот, от около 10

88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична непрерывной последовательности VEGFR-1 человека дикого типа, например последовательности, которая на по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична непрерывной последовательности SEQ ID NO: 23).

В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF содержит часть (например, от около 20 аминокислот до около 745 аминокислот или любой из поддиапазонов этого диапазона, описанных в данном документе) внеклеточной области VEGFR-2 (например, смежную последовательность из VEGFR-2 человека дикого типа (например, смежную последовательность, содержащую один или более (например, один, два, три, четыре, пять, шесть или семь) иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-2 человека дикого типа (например, SEQ ID NO: 26) или последовательность, которая на по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична непрерывной последовательности VEGFR-2 человека дикого типа, например, последовательность, которая на по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична непрерывной последовательности SEQ ID NO: 26).

В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области VEGFR-1 (например, любую из частей внеклеточной области VEGFR-1, описанных в данном документе) и часть внеклеточной области VEGFR-2 (например, любой из частей внеклеточной области VEGFR-2, описанной в данном документе). Например, растворимый рецептор VEGF может содержать один или более (например, два, три, четыре, пять, шесть или семь) иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-1 человека дикого типа и один или более (например, два, три, четыре, пять, шесть или семь) иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-2 человека дикого типа (например, афлиберцепт).

В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF содержит часть (например, от около 20 аминокислот до около 751 аминокислот или любой из поддиапазонов этого диапазона, описанных в данном документе) внеклеточной области VEGFR-3 (например, смежную последовательность из VEGFR-3 человека дикого типа (например, смежную последовательность, содержащую один или более (например, один, два, три, четыре, пять, шесть или семь) иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-3 человека дикого типа (например, SEQ ID NO: 29) или последовательность, которая на по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична непрерывной последовательности VEGFR-3 человека дикого типа, например, последовательность, которая на по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична непрерывной последовательности SEQ ID NO: 29).

Неограничивающие примеры внеклеточных областей различных VEGFR-1 млекопитающих, различных VEGFR-2 млекопитающих и различных VEGFR-3 млекопитающих описаны в данном документе. Неограничивающие примеры белковых и нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок рецептора VEGF дикого типа, приведены ниже. Специалист в данной области техники может оценить, что замена аминокислоты, которая сохраняется в зависимости от вида, с большей вероятностью приведет к изменению функции белка, тогда как замена в положении аминокислоты, которая меняется в зависимости от вида, менее вероятно, будет иметь влияние на функцию белка.

Последовательность белка изоформы 2 рецептора 1 VEGF человека (SEQ ID NO: 17)

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTHIMQAGQTLHLQCR
GEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVP
TSKKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTL
IPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRP
VKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTI
DKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLS
MKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFK
NLTATLIVNVKPIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSE
ARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMAIIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASN
KVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLKMPTEGEDLKLSTVKNKFLYRDVTWILLRTVNNR
TMHYSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTYACRARNVYTGEEILQKKEITIRGE
HCNKKAVFSRISKFKSTRNDCTTQSNVKH

кДНК изоформы 2 рецептора 1 VEGF человека (SEQ ID NO: 18)

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCT
GCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTTAAAAGATCCTGAACTGAGTTTAAA
AGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGG
AAGCAGCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGCTG
AGCATAACTAAATCTGCCTGTGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAACC
TTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTGTA
CCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACA

GGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGA
 AGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTT
 AAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAG
 TAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCT
 GTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAACTATCTCACACATCGACAA
 ACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCACGCCAGTCAAATTACTIONTAG
 AGGCCATACTCTTGTCCCTCAATTGTACTIONTACCCTCCCTTGAACACGAGAGTTCA
 AATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAA
 TTGACCAAAGCAATTCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTTCTTACTATTGACAAAA
 TGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTGTAAGGAGTGGACCATCATTC
 AAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCATTCATCACTGTGAAACAT
 CGAAAACAGCAGGTGCTTGAAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGCTCTCTAT
 GAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTTACCTGC
 GACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTAATTATCAAGGACGT
 AACTGAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCATAAACAGTCAAATG
 TGTTTTAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCAGATTTACGAAA
 AGGCCGTGTCATCGTTTTCCAGACCCGGCTCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCC
 TGACTIONTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTCTGGCACCCCT
 GTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTTCCTAATAATGAAGAGTCCCT
 TTATCCTGGATGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGC
 ATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGATGGCTAGCACCTTGGTTGTGGCTGACTC
 TAGAATTTCTGGAATCTACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGACTGTGGGAAG
 AAACATAAGCTTTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGTTTCATGTTAACTTGGAAAA
 AATGCCGACGGAAGGAGAGGACCTGAAACTGTCTTGCACAGTTAACAAGTTCTTAT
 ACAGAGACGTTACTTGGATTTTACTGCGGACAGTTAATAACAGAACAATGCACTAC
 AGTATTAGCAAGCAAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCACTCCATCACTCTTAATCTT
 ACCATCATGAATGTTTCCCTGCAAGATTCAGGCACCTATGCCTGCAGAGCCAGGAAT
 GTATACACAGGGGAAGAAATCCTCCAGAAGAAAGAAATTACAATCAGAGGTGAGC
 ACTGCAACAAAAAGGCTGTTTTCTCTCGGATCTCCAAATTTAAAAGCACAAAGGAATG
 ATTTGTACCACACAAAGTAATGTAAAACATTAA

Последовательность белка изоформы 3 рецептора 1 VEGF человека (SEQ ID NO: 19) (sFlt1-14)

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTHIMQAGQTLHLQCR
 GEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVP
 TSKKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTL
 IPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTIIDVQISTPRP
 VKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTI
 DKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLS
 MKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFK
 NLATLIVNVKPOIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSE

ARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMAIIIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASN
 KVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLEKMPTEGEDLKLSTVKNFLYRDVTWILLRVTNNR
 TMHYSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTYACRARNVYTGEEILQKKEITIRDQ
 EAPYLLRNLSDHTVAISSSTLDCHANGVPEPQITWFKNNHKIQEPELYTSTSPSSSSSSP
 LSSSSSSSSSSSS

кДНК изоформы 3 рецептора 1 VEGF человека (SEQ ID NO: 20)

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCT
 GCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTAAGATCCTGAACTGAGTTAAA
 AGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGG
 AAGCAGCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGCTG
 AGCATAACTAAATCTGCCTGTGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAACC
 TTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTGTA
 CCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACA
 GGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGA
 AGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTT
 AAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAG
 TAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCT
 GTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAA
 ACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCACGCCAGTCAAATTACTTAG
 AGGCCATACTCTTGTCCCTCAATTGACTGCTACCCTCCCTTGAACACGAGAGTTCA
 AATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAA
 TTGACCAAAGCAATTCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTTCTTACTATTGACAAAA
 TGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTAAAGGAGTGGACCATCATTC
 AAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCATTTCATCACTGTGAAACAT
 CGAAAACAGCAGGTGCTTGAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTAT
 GAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTACCTGC
 GACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTAATTATCAAGGACGT
 AACTGAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCATAAAAACAGTCAAATG
 TGTTTAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCCAGATTTACGAAA
 AGGCCGTGTCATCGTTTCCAGACCCGGCTCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCC
 TGACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTCTGGCACCCCT
 GTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTTCCTAATAATGAAGAGTCTT
 TTATCCTGGATGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGC
 ATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGATGGCTAGCACCTTGGTTGTGGCTGACTC
 TAGAATTTCTGGAATCTACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGACTGTGGGAAG
 AAACATAAGCTTTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGTTTCATGTAACTGGAAAA
 AATGCCGACGGAAGGAGAGGACCTGAAACTGTCTTGCACAGTTAACAAGTTCTTAT
 ACAGAGACGTTACTTGGATTTTACTGCGGACAGTTAATAACAGAACAATGCACTAC
 AGTATTAGCAAGCAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCACTCCATCACTCTTAATCTT
 ACCATCATGAATGTTTCCCTGCAAGATTCAGGCACCTATGCCTGCAGAGCCAGGAAT

GTATACACAGGGGAAGAAATCCTCCAGAAGAAAGAAATTACAATCAGAGATCAGG
 AAGCACCATACCTCCTGCGAAACCTCAGTGATCACACAGTGGCCATCAGCAGTTCCA
 CCACTTTAGACTGTCATGCTAATGGTGTCCCGAGCCTCAGATCACTTGGTTAAAA
 ACAACCACAAAATACAACAAGAGCCTGAACTGTATACATCAACGTCACCATCGTCA
 TCGTCATCATCACCATTGTCATCATCATCATCATCGTCATCATCATCATCATAG

Последовательность белка изоформы 4 рецептора 1 VEGF человека (SEQ ID NO: 21)

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTHIMQAGQTLHLQCR
 GEAAHKWSLPEMVSKESEKRSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVP
 TSKKKESETAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPLDTL
 IPDGKRIIWDNRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQNTIIDVQISTPRP
 VKLLRGHTLVLNCTATPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNHANIFYSVLTI
 DKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQVLETVAGKRSYRLS
 MKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLLIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFK
 NLATLIVNVKPKQIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNSHSE
 ARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMAIEGKNKLPPANSSFMLPPTSFSNSNYFHF
 LP

кДНК изоформы 4 рецептора 1 VEGF человека (SEQ ID NO: 22)

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCT
 GCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTAAGATCCTGAACTGAGTTAAA
 AGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGG
 AAGCAGCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGCTG
 AGCATAACTAAATCTGCCTGTGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAAC
 TTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTGTA
 CCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACA
 GGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGA
 AGGAAGGGAGCTCGTCATCCCTGCCGGGTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTT
 AAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAG
 TAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCT
 GTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAA
 ACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCACGCCAGTCAAATTACTTAG
 AGGCCATACTTTGCCTCAATTGTAAGTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGTTCA
 AATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAA
 TTGACCAAAGCAATCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTCTTACTATTGACAAAA
 TGCAGAACAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTAAGGAGTGGACCATCATTC
 AAATCTGTAAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCATTCACTGTGAAACAT
 CGAAAACAGCAGGTGCTTGAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTAT
 GAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTACCTGC
 GACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTAATTATCAAGGACGT
 AACTGAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCATAAAACAGTCAAATG

TGTTTAAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCCAGATTTACGAAA
 AGGCCGTGTCATCGTTTTCCAGACCCGGCTCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCC
 TGA CTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTCTGGCACCCCT
 GTAACCATAATCATTCGGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTTC AATAATGAAGAGTCCT
 TTATCCTGGATGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGC
 ATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGCTTCCACCAGCTAACAGTTCTTTCATGTTG
 CCACCTACAAGCTTCTCTTCCAAC TACTCCATTTCCCTCCGTGA

Внеклеточная область VEGFR-1 человека дикого типа (SEQ ID NO: 23) (семь Ig-подобных доменов показаны жирным шрифтом и подчеркнуты)

sklk dpelslkg tq himqagqtlh lqcrgeaahk wslpemvske serlsitksa cgrngkqfcs tltlnaqan
htgfysckyl avptskkket esaiyifisd tgrpfvemys eipeihmte grelvipcrv tspnitvilk kfpdltdlip
gkriiwdsrk gfiisnatyk eiglltceat vnglyktny lthrqntii dvqistprpv kllrghltvl nctattplnt
rvqmtwsypd eknkrasvrr ridqsnshan ifysvltidk mqnkdkglyt crvrsgpsfk svntsvhiyd
 kafitvkhkr qqvletvagk rsyrlsmkvk afpspevvwl kdglpateks aryltrgysl iikdvteeda gnytilsik
qsnvfknlta tlivnvkpgi vekavssfpd palyplgsrq iltctaygip qptikwfw hp cnhnhsearc dfcsnneesf
ildadsnmgn riesitqрма иiegknkmas tlvvadsris giviciasnk vgtvgnisf vitdvpngfh vnlekmpteg
edlklsetvn kflyrdvtwi llrtvnnrtm hysiskqkma itkehsitln ltimvslqd sgtyacrarn vytgeeilqk
 keitirdqea pyllrnlsdh tvaissstfl dchangvpep qitwfknnhk iqqepgiil pgsstlfier vteedegvyh
ckatnqkgs v essayltvqg tsdksnle

Внеклеточная область VEGFR-1 мыши дикого типа (SEQ ID NO: 24)

ygsksklk vpelslkg tq hvmqagqtlf lkcrgeaahs wslpttvsqe dkrlsitpps acgrdnrqfc stltdtaqa
 nhtglycry lptstskkkk aessiyifvs dagspfiemh tdipklvhmt egrqliiper vtspnvtvl kkpfdltlp
 dgqritwdsr rgfiianaty keigllncea tvnghlyqtn ylthrqnti ldvqirppsp vrllhgqtlv lncatteln
 trvqmswnyp gkatkrasir qridrshshn nvfhsvlkin nvesrdkgly tcrvksqssf qsfntsvhvy ekgfsvkhr
 kqpvqettag rrsyrlsmkv kafpspeivw lkdgsptlk sarylvhgys liikdvtted agdytillgi kqsrflknl
 atlivnvkpg iyeksvslp splyplgsr qvltctvygi prptitwlwh pchhnhsker ydfctenees fildpsnlg
 nriesisqrm tviegtntkv stlvvadsqt pgiyscrafn kigtvern timer fyvtdvpngf hvslekmpae gedlklscvv
 nkflyrditw illrtvnnrt mhhsiskqkm attqdysitl nlviknvsle dsqtyacrarn niytedilr ktevlvrdse
 aphllqnl sd yevisgstt ldcqargvpa p qitwfknnh kiqqepgiil pgnstlfie rvteedegvy rcratnqkga
 vesaayltvq gtsdksnle

Внеклеточная область VEGFR-1 крысы дикого типа (SEQ ID NO: 25)

ygsksklk gpelslkg tq hvmqagqtlf lkcrgeaahs wslpttvsqe dkklsvtrsa cgrnnrqfcs tltlnmaqan
 htglyscryl pkstskkkk esaiyifvsd agspfiemhs dipklvhmt greliipcrv tspnitvilk kfpdaltpd
 gqriawdsrr gfiiianaty eiglltceat vnglyqtsy lthrqntil dvqisppspv rflrgqtlvl nctvtdlnt
 rvqmswnypg katkrasir ridqsnphsn vfhsvlkinn vesrdkglyt crvksqssf tfntsvhvy ekgfsvkhrk
 qqvqetiagk rshrlsmkvk afpspevvwl kdgvpateks arysvhgysl iikdvtaeda gdytillgik qsklfrnlta
 tlivnvkpgi yeksvslps pplyplgsrq vltctvygip qptikwfw hp chynhskern dfcfsesef ildssnign
 riegitqrm viegtntkvs tlvvadsrtp gsysckafnk igtverdirf yvtdvpngfh vslekipteg edlklscvvs
 kflyrditwi llrtvnnrtm hhsiskqkma ttqdysitln lviknvsled sgtyacrarn iytgeeilr tevlvrdlea plllqnl sd
 evsisgstt dcqargvpap qitwfknnhk iqqepgiil pgnstlfier vteedegvy rcratnqkgs v essayltvqg

tsdksnle

Внеклеточная область VEGFR-2 человека дикого типа (SEQ ID NO: 26) (семь Ig-подобных доменов показаны жирным шрифтом и подчеркнуты)

asvglpsvsld lprlsiqkdi ltikanttlq itcrgqrdd wlwpnnsqgs eqrvevtecs dglfckltli pkvigndtga ykcfyretld asviyvyvqd yrspfiavsvsdqhgvyvite nknktvvice lgsisnlvsv lcarypekrf vpdgnriswd skkgftipsy misvagmvfc eakindesyq simyivvvvg yriydvvlsp shgielsvge klvlnctart elngidfnw eypskqhkh klvnrldktq sgsemkfls tlidgvtrs dqglytcaas sglmtkknst fvrvehkpfv afgsgmeslv eatvgervri pakylgyppp eikwykngip lesnhtikag hvltimevse rdtgnytvil tnpi skkekqs hvvslvvyvp pqigeekslis pvdsvqygtt qtlctvyai ppphihwyw gleecanep sqavsvtnpy pceewrsved fgggnkievn knqfaliegk nktvstlvig aanvsalykc eavnkvgrge rvisfhvtrg peitlqpdmq pteqesvslw ctadrstfen ltwyklgpq lpihvgeip pvcknldtlw klnatmfsns ndilimelk naslqdgdy vlaqdrktk krhcvvrlt vlervaptit gnlenqttsi gesievscta sgnpppqimw fkdneltved sgivlkdgnr nltrrvrke deglytcqac svlgcakvea ffii iegaqek tnle

Внеклеточная область VEGFR-2 мыши дикого типа (SEQ ID NO: 27)

asvglpgdflh ppklstqkdi ltilanttlq itcrgqrdd wlwpnaqrds eervlvtecg ggdsifcktl tiprvvgndt gaykcsyrdv diastvyvvyv rdyrpfias vsdqhgvyi tenknktvvi pergsisnlvslcarypek rfvpdgnris wdseigftlp symisyagmv fceakindet yqsimyivvv vgyriydvil sppheilsa geklvlncta rtelngldf twhsppsksh hkkivnrsvk pfgtvakmf llttiesvt ksdqgeytcv assgrmikrn rtfvrvtkpf fiafgsgmks lveatvgsqv ripvkylsyv apdikwyrng rpienytmv vgdeltimv terdagnytv iltnpismek qshmvslvvn vppqigekal ispmvdyqyg tmqtlctvy anpplhhiqw ywqleecasy rpgqtspyac kewrhvedfq ggnkievtkn qyaliegknk tvstlviaaa nvsalykcea inkagrgerv isfhvirgpe itvqpaaqpt eqesvsllct adrnfenlt wyklsqats vhmgesltpv cknldalwkl ngtmfnsnndi livafqna slqdgdyvc saqdkkktkr hclvkqliil ermapmitgn lenqtttge tievtcpasg nptphitwfk dnetlvedsg ivlrdgnrnl trrvrkedg glytcqacnv lgcaraetlf iiegaqektn le

Внеклеточная область VEGFR-2 крысы дикого типа (SEQ ID NO: 28)

asvglpgdslh ppklstqkdi ltilanttlq itcrgqrdd wlwpntprds eervlvtecg dsifckltlv prvvgndtga ykcfyrdtdv ssivvyvvyvq hrspfiavsvsdqhgvyvite nknktvvice rgsisnlvsvlcarypekrf vpdgnriswd sekgtipsy misyagmvfc eakindetyq simyivlvvg yriydvvlsp pheielsage klvlnctart elngldfsw qfpsskqhkh kivnrsvksl pgtvakmfls tldsvtkv dgeytcay sglmtkknkt fvrvtkpfiafgsgmkslv eatvgsqvri pvkylsyvpadikwyrng rpienytmivgdeltimvse rdagnytvil tnpiismekqs hmvslvvnvp pqigekalis pmdsvdyqygtm qtlctvyan pplhhiqwyw qleecasyrp sqtnpytcke wrhvkdfqgg nkievtknqy aliegknktv stlviaaayv salykceain kagrgervis fhvirgpeit vqpatqpter esmllctad rntfenltwy klgsqatsvh mgesltpvck nldalwklng tvfnsnndi livafqnasl qdqgnyvcsa qdkkktkrhc lvkqlviler mapmitgnle nqtttgeti evvcptsgnp tplitwfkdn etlvedsgiv lkdgnrnltrrvrkedggl ytcqacnvlg caraetlfii egvqektnle

Внеклеточная область VEGFR-3 человека дикого типа (SEQ ID NO: 29) (семь Ig-подобных доменов показаны жирным шрифтом)

ysmtp tlniteeshv idtgdslls crghplewa wpgaqapat gdkdsedgv vrdegetdar pvckvillhe vhandtgsyv vykvikari egttaassyv fvrdfeqpfi nkpdtllvnr kdamwvpcv sipglvnlr sqssvlwpg qevvddrrg mlvstplld alylqettw gdqdfslsnpf lvhitgnely diqllprksl ellvgeklv

nectvwaefns gvtfdwdypg kqaergkwvp errsqqthte lssiltihnv sqhdldgsyvc kanngiqrfr estevivhen
 pfisvewlkg pileatagde lvklpvklaa ypppefqwyk dgkalsgrhs phalvlkevt eastgtvyla lwnsaaglr
 nislelvvnnv ppihekeas spsiysrhr qaltctaygv plplsiqwhw rpwtpeckmfa qrslrrrqqq
 dlmpqcrdwr avttqdavnp iesldtwtef vegknktvsk lviqnanvsa mykcvvsnkq gqderliyfy
 vttdgfti eskpseelle gqpvllscqa dsvkyehlrw yrlnlstlhd ahgnpllldc knvhlfatpl aasleevapg
 arhatlsi prvapehegh yvcevqdrsr hdkhchkkyl svqaleaprl tqnltdllvn vsdslemqcl vagahapsiv
 wykderlee ksgvdladsn qklsiqrvre edagrylcsv cnakgcvnss asvavegsed kgsmeivilv

Внеклеточная область VEGFR-3 мышцы дикого типа (SEQ ID NO: 30)

ysmtpp tlnitedsyv idtgdsllsis crgqhplewt wpgaqeavlth ggkdsedtrv vhdcegtear pyckvlllaq
 thanntgsyh cyukyikari egtaastyv fvrdfkhpfi nkpdtllvr kdsmwvpcvl sipglntlr sqssalhpdg
 qevlwddrrg mrvptqlrd alylcettw gdqnlfnlf vwhitgnely diqlypkksm ellvgeklvl nectvwaefds
 gvtfdwdypg kqaerakwvp errsqqthte lssiltihnv sqndlgpyvc eanngiqrfr estevivhek pfisvewlkg
 pvleatagde lvklpvklaa ypppefqwyk drkavtgrhn phalvlkevt easagvytla lwnsaaglrq nislelvvnnv
 ppihekeas spsiysrhr qtlctaygv pqlsvqwhw rpwtpeckmfa qrslrrrqqr dgmpqcrdwr evttqdavnp
 iesldswtef vegknktvsk lviqnanvsa mykcvvvnkv gqderliyfy vttdgfsi esepedple gqsvrlsca
 dnytyehlrw yrlnlstlhd aqgnpllldc knvhlfatpl eanleaepg arhatlsni prvapedegd yvcevqdrsr
 qdkhchkkyl svqaleaprl tqnltdllvn vsdslemrcp vagahapsiv wykderlek esgidladsn qklsiqrvre
 edagrylcsv cnakgcvnss asvavegsed kgsme

Внеклеточная область VEGFR-3 крысы дикого типа (SEQ ID NO: 31)

ysmtpp tlnitedsyv idtgdsllsis crgqhplewt wrgaqeavlth ggkdsedtrv vqdcegtear pyckvlllaq
 thanntgsyh cyukyikari egtaastyv fvrdfkhpfi nkpdtllvr kdsmwvpcvl sipglntlr sqssalhpdg
 qevlwddrrg mrvptqlrd alylcettw gdqnlfnlf vwhitgnely diqlypkksl ellvgeklvl nectvwaefds
 gvtfdwdypg kqaerakwvp errsqqthte lssiltihnv sqhdldgsyvc eanngiqqfr estevivhek pfisvewlkg
 pvleatagde mvklpvklaa ypppefqwyk drkavtgrhn phalvlkevt easagvytla lwnsaaglrq nislelvvnnv
 ppihekeas spsiysrhr qtlctaygv pqlsvqwhw rpwtpeckmfa qrslrrrqqr dgmpqcrdwr evttqdavnp
 iesldswtef vegknktvsk lviqnanvsa mykcvvvnkv gqderliyfy vttdgfsi esepedple gqsvrlsca
 dnytyehlrw yrlnlstlhd aqgnpllldc knvhlfatpl eanleaepg arhatlsni prvapedegd yvcevqdrsr
 qdkhchkkyl svqaleaprl tqnltdllvn vrtslmrcp vagahapsiv wykderlek esgidladsn qklsiqrvre
 edagrylcsv cnakgcvnss asvavegsed kgsme

В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF может дополнительно содержать стабилизирующий домен (например, домен Fc или часть домена Fc). Например, стабилизирующий домен может представлять собой домен Fc IgG1 (например, домен Fc IgG1 человека дикого типа или его часть). Например, стабилизирующий домен может представлять собой домен Fc IgG2 (например, домен Fc IgG2 человека дикого типа или его часть). Например, стабилизирующий домен может представлять собой домен Fc IgG3 (например, домен IgG3 человека дикого типа или его часть).

Неограничивающие примеры домена Fc IgG1 человека дикого типа, домена Fc IgG2 человека дикого типа и домена Fc IgG3 человека дикого типа показаны ниже.

Домен Fc IgG1 человека дикого типа (SEQ ID NO: 32)

pcrapellgg psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn

styrvsvlt vlhqdwngk eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsrdel tknqvslyc lvkgfypsdi
 avewesngqr ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw qqgnvfscsv mhealthnhyt qkslspsgk

Область Fc IgG2 человека дикого типа (SEQ ID NO: 33)

vesppcrapp vagpsvflfp pcpkdtlmis rpevtcvvv dvshedpevq fnwyvdgvev hnaktkpre
 qfnstfrvvs vltvvhqdw ngkeykckvs nkglpapiek tisktkgqpr epqvylpps reemtknqvs ltlvkgfyf
 sdiawesng qppennykt ppmlsdgsf flyskltvdk srwqqgnvfv csvmhealthn hytqkslspsgk

Область Fc IgG3 человека дикого типа (SEQ ID NO: 34)

tcprcappel lggpsvflfp pcpkdtlmis rpevtcvvv dvshedpevq fkwvyvdgvev hnaktkpre
 qfnstfrvvs vltvlhqdw ngkeykckvs nkalpapiek tisktkgqpr epqvylpps reemtknqvs ltlvkgfyf
 sdiawesng qppennykt ppmlsdgsf flyskltvdk srwqqgnvfv csvmhealthn rftqkslspsgk

В некоторых вариантах осуществления растворимый рецептор VEGF представляет собой афлиберцепт (Eylea®). Афлиберцепт содержит части внеклеточных доменов 1 и 2 рецепторов VEGF человека, слитые с частью Fc IgG1 человека (размер ~ 115 кДа). Афлиберцепт ингибирует активность VEGF-A, VEGF-B и PlGF. Афлиберцепт имеет K_D к VEGF-A, равную 0,49 пМ. См., например, WO 2017/218974.

Аминокислотная последовательность афлиберцепта (SEQ ID NO: 12)

SDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDLPDGGKRIIW
 DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK
 LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS
 DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPG

В некоторых вариантах осуществления растворимый рецептор VEGF содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичны SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления растворимый рецептор VEGF содержит внеклеточный домен, который представляет собой или содержит последовательность SEQ ID NO: 12, за исключением того, что он содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен в последовательности SEQ ID NO: 12.

Дополнительные примеры растворимых рецепторов VEGF описаны, например, в Kendall et al., PNAS 90: 10705-10709, 1993; Kendall et al., Biochem Biophys Res Commun 226: 324-328, 1996; Failla et al., Int J Mol Sci 19(5):pii. E1306, 2018 и Jung et al., PLoS One 7(9): e44572.

Векторы.

Рекомбинантные векторы AAV или "гAAV" обычно состоят, как минимум, из трансгена или его части и регуляторной последовательности и, необязательно, 5' и 3' инвертированных концевых повторов AAV (ITR). Такой рекомбинантный вектор AAV упакован в капсид и доставлен в выбранную клетку-мишень (например, в улитковую волосковую клетку).

Последовательности AAV вектора обычно содержат действующие в цис-положении 5'- и 3'-последовательности ITR (см, например, B.J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168, 1990). Типичные последовательности ITR AAV имеют длину около 145 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 75% типичной последовательности ITR (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%) включены в вектор AAV. Способность изменять эти последовательности ITR находится в пределах квалификации специалиста в данной области техники (см., например, тексты, такие как Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989 и K. Fisher et al., J Virol. 70:520-532, 1996). В некоторых вариантах осуществления любая из описанных в данном документе кодирующих последовательностей фланкирована 5' и 3' последовательностями ITR AAV в векторах AAV. Последовательности ITR AAV могут быть получены из любого известного AAV, включая идентифицированные в данное время типы AAV.

Векторы AAV, описанные в данном документе, могут содержать любой из регуляторных элементов, описанных в данном документе (например, один или более из промотора, сигнальной последовательности полиаденилирования (поли (A)) и IRES).

В некоторых вариантах осуществления вектор(ы) представляет собой аденовирусный вектор (см., например, Dmitriev et al. (1998) *J. Virol.* 72: 9706-9713; и Poulin et al., *J. Virol* 8: 10074-10086, 2010). В некоторых вариантах осуществления вектор(ы) представляет собой ретровирусные векторы (см., например, Maier et al. (2010) *Future Microbiol* 5: 1507-23).

Представленные в данном документе векторы могут быть разных размеров. Выбор вектора, который используется в любой из описанных в данном документе композиций, наборов и способов, может зависеть от размера вектора.

В некоторых вариантах осуществления вектор(ы) может иметь общее количество нуклеотидов до 10 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор(ы) может иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 10 т.п.н. или от около 9 т.п.н. до около 10 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления вектор(ы) является лентивирусным и может иметь общее количество нуклеотидов до 8 т.п.н. В некоторых примерах лентивирус(ы) может иметь общее количество нуклеотидов от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н. или от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления вектор(ы) является аденовирусным и может иметь общее количество нуклеотидов до 8 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления аденовирус(ы) может иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н. или от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления вектор(ы) представляет собой адено-ассоциированный вирус и может иметь общее количество нуклеотидов до 5 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления вектор(ы) AAV может содержать общее количество нуклеотидов в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н. или от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н.

Множество различных способов, известных в данной области техники, можно использовать для введения любого из векторов, раскрытых в данном документе, в клетку млекопитающего (например, клетку внутреннего уха, кохлеарную внутреннюю волосковую клетку). Неограничивающие примеры

способов введения нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего включают: липофекцию, трансфекцию (например, трансфекцию фосфатом кальция, трансфекцию с использованием высоковетвленных органических соединений, трансфекцию с использованием катионных полимеров, трансфекцию на основе дендримера, оптическую трансфекцию, трансфекцию на основе частиц (например, трансфекция наночастиц) или трансфекцию с использованием липосом (например, катионных липосом)), микроинъекцию, электропорацию, сжатие клеток, сонопорацию, слияние протопластов, импалфекцию, гидродинамическую доставку, генную пушку, магнитофекцию, вирусную трансфекцию и нуклеофекцию.

Любой из векторов, описанных в данном документе, может дополнительно содержать контрольную последовательность, например контрольную последовательность, выбранную из группы последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, последовательности промотора, последовательности энхансера, последовательности сплайсинга РНК, полиаденилирования (полиА) и консенсусной последовательности Козака. Неограничивающие примеры этих контрольных последовательностей описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой нативный промотор, конститутивный промотор, индуцибельный промотор и/или тканеспецифичный промотор.

Промоторы.

Термин "промотор" означает последовательность ДНК, распознаваемую ферментами/белками в клетке млекопитающего, необходимую для инициации транскрипции конкретного гена. Промотор обычно относится, например, к нуклеотидной последовательности, с которой связывается РНК-полимераза и/или любой связанный с ней фактор, и с которой иницируется транскрипция. Неограничивающие примеры промоторов описаны в данном документе. Дополнительные примеры промоторов известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления вектор (например, вектор аденоассоциированного вируса (AAV)), кодирующий антитело (например, антитело, которое специфически связывается с VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент), может содержать промотор и/или энхансер. Вектор, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может содержать любой из промоторов и/или энхансеров, описанных в данном документе или известных в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор, конститутивный промотор, клеточный промотор млекопитающего, вирусный промотор, химерный промотор, сконструированный промотор, тканеспецифичный промотор или любой другой тип промотора, известный в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II, такой как промотор РНК-полимеразы II млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы III, включая, без ограничения, промотор H1, промотор U6 человека, промотор U6 мыши или промотор U6 свиньи. Промотор, как правило, будет таким, который способен стимулировать транскрипцию во внутренней волосковой клетке. В некоторых примерах промотор является специфичным для улитки промотором или ориентированным на улитку промотором.

В данной области техники известно множество промоторов, которые можно использовать в данном документе. Неограничивающие примеры промоторов, которые можно использовать в данном документе, включают промоторы от: EF1a человека, цитомегаловируса человека (CMV) (патент США № 5168062), убиквитина С человека (UBC), фосфоглицерат киназы I мыши, полиома аденовируса, вируса обезьяны 40 (SV40), β-глобина, β-актина, α-фетопротейна, γ-глобина, β-интерферона, γ-глутамилтрансферазы, вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), вируса саркомы Рауса, инсулина крысы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, металлотиюнеина II (MT II), амилазы, катепсина, мускаринового рецептора M1, ретровирусного LTR (например вируса Т-клеточного лейкоза человека HTLV), ITR AAV, интерлейкина-2, коллагеназы, полученный из тромбоцитов фактор роста, аденовируса 5 E2, стромелизина, гена Mx мыши, белков, регулируемых глюкозой (GRP78 и GRP94), α-2-макроглобулина, виментина, гена ГКГС класса I, H-2k b, HSP70, пролиферина, фактора некроза опухоли, гена α тиреотропного гормона, легкой цепи иммуноглобулина, Т-клеточного рецептора, DQα и DQβ HLA, рецептора интерлейкина-2, ГКГС класса II, HLA-DRα ГКГС класса II, мышечной креатинкиназы, преальбумина (транстиретина), эластазы I, гена альбумина, c-fos, c-HA-ras, молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), гистона H2B (TH2B), гормона роста крысы, сывороточного амилоида человека (SAA), тропонина I (TN I), мышечной дистрофии Дюшенна, вируса иммунодефицита человека и вируса лейкоза гиббонов (GALV). Дополнительные примеры промоторов известны в данной области техники, см., например, Lodish, Molecular Cell Biology, Freeman and Company, New York 2007. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой немедленно-ранний промотор CMV. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CAG или промотор CAG/CBA.

Термин "конститутивный" промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, когда функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела), вызывает транскрипцию РНК из нуклеиновой кислоты в клетке млекопитающего в большинстве или во всех физиологических условиях.

Примеры конститутивных промоторов включают, без ограничения, промотор LTR ретровирусного вируса саркомы Рауса (RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (см., например, Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор бета-актина, промотор фосфоглицеролкиназы (PGK) и промотор EF1-альфа (Invitrogen).

Индукцибельные промоторы позволяют осуществлять регуляцию экспрессии генов, и их можно регулировать с помощью экзогенно поставляемых соединений, факторов окружающей среды, таких как температура, или наличия специфического физиологического состояния, например, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. Индукцибельные промоторы и индукцибельные системы доступны из множества коммерческих источников, включая, помимо прочего, компании Invitrogen, Clontech и Ariad. Дополнительные примеры индукцибельных промоторов известны в данной области техники.

Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых экзогенно поставляемыми соединениями, включают индуцируемый цинком промотор овечьего металлотионина (MT), промотор дексаметазона (Dex) -индуцируемого вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промоторную систему полимеразы T7 (WO 98/10088); промотор экдизона насекомых (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93:3346-3351, 1996), тетрациклин-репрессируемая система (Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 89:5547-5551, 1992), тетрациклином-индуцируемая система (Gossen et al., Science 268:1766-1769, 1995, см. также Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 2:512-518, 1998), RU486-индуцируемая система (Wang et al., Nat. Biotech. 15:239-243, 1997) и Wang et al., Gene Ther. 4:432-441, 1997), и рапамицин-индуцируемая система (Magari et al. J. Clin. Invest. 100:2865-2872, 1997).

Термин "тканеспецифичный" промотор относится к промотору, который активен только в определенных типах клеток и/или тканях (например, транскрипция определенного гена происходит только в клетках, экспрессирующих регуляторные белки транскрипции, которые связываются с тканеспецифичным промотором).

В некоторых вариантах осуществления регуляторные последовательности придают тканеспецифические возможности экспрессии генов. В некоторых случаях тканеспецифичные регуляторные последовательности связывают тканеспецифичные транскрипционные факторы, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифичным образом.

Типичные тканеспецифичные промоторы включают, без ограничения, печеночно-специфический промотор тироксинсвязывающего глобулина (TBG), инсулиновый промотор, промотор глюкагона, промотор соматостатина, промотор панкреатического полипептида (PPY), промотор синапсина-1 (Syn), промотор креатинкиназы (MCK), промотор десмина (DES) млекопитающего, промотор тяжелой цепи альфамиозина (α -MHC) и промотор сердечного тропонина T (cTnT). Дополнительные типичные промоторы включают бета-актиновый промотор, основной промотор вируса гепатита B (Sandig et al., Gene Ther. 3:1002-1009, 1996), промотор альфа-фетопротеина (AFP) (Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther. 7:1503-1514, 1996), промотор остеокальцина костей (Stein et al., Mol. Biol. Rep. 24:185-196, 1997); промотор сиалопротеина костей (Chen et al., J. Bone Miner. Res. 11:654-664, 1996), промотор CD2 (Hansal et al., J. Immunol. 161:1063-1068, 1998); промотор тяжелой цепи иммуноглобулина; промотор альфа-цепи рецептора T-клеток, нейрональный промотор, такой как промотор нейрон-специфической енолазы (NSE) (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol. 13:503-515, 1993), промотор гена легкой цепи нейрофиламента (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 88:5611-5615, 1991) и нейрон-специфический промотор гена *vgl* (Piccioli et al., Neuron 15:373-384, 1995).

В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой специфичный для улитки промотор. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой промотор, специфичный для волосковых клеток улитки. Неограничивающие примеры специфичных для волосковых клеток улитки промоторов включают, без ограничения, промотор АТОН1, промотор POU4F3, промотор LHX3, промотор MYO7A, промотор MYO6, промотор α 9ACHR и промотор α 10ACHR. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой специфичный для волосковых клеток улитки промотор, такой как промотор PRESTIN или промотор ONCOMOD. См., например, Zheng et al., Nature 405:149-155, 2000; Tian et al. Dev. Dyn. 231:199-203, 2004 и Ryan et al., Adv. Otorhinolaryngol. 66: 99-115, 2009.

Энхансеры.

В некоторых случаях вектор (например, вектор AAV) может содержать последовательность энхансера. Термин "энхансер" относится к нуклеотидной последовательности, которая может повысить уровень транскрипции нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес белок (например, антигено, которое специфически связывается с VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент, или растворимый рецептор VEGF). Последовательности энхансеров (длиной 50-1500 пар оснований) обычно повышают уровень транскрипции путем предоставления дополнительных сайтов связывания для белков, связанных с транскрипцией (например, факторов транскрипции). В некоторых вариантах осуществления энхансерная последовательность находится в интронной последовательности. В отличие от промоторных последовательностей энхансерные последовательности могут действовать на гораздо большем расстоя-

нии от сайта начала транскрипции (например, по сравнению с промотором). Неограничивающие примеры энхансеров включают энхансер RSV, энхансер CMV и энхансер SV40.

Сигнальная последовательность поли (А).

В некоторых вариантах осуществления любой из векторов, представленных в данном документе (например, вектор AAV), может содержать сигнальную последовательность полиаденилирования (поли (А)). Большинство зарождающихся эукариотических мРНК имеют поли (А) хвост на своем 3'-конце, который добавляется во время сложного процесса, который включает расщепление первичного транскрипта и реакцию связанного полиаденилирования, вызванную сигнальной последовательностью поли (А) (см., например, Proudfoot et al., Cell 108:501-512, 2002). Хвост поли (А) придает мРНК стабильность и транспортируемость (Molecular Biology of the Cell, Third Edition by B. Alberts et al., Garland Publishing, 1994). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли (А) расположена на 3' относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела, легкую цепь антитела, фрагмент антигенсвязывающего антитела или растворимый рецептор VEGF.

Используемый в данном документе термин "полиаденилирование" относится к ковалентной связи полиаденилового фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. У эукариот большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными на 3'-конце. 3'-poly(A)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (например, 50, 60, 70, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 или 5000), добавленных к пре-мРНК посредством действия фермента полиаденилат-полимеразы. У высших эукариот хвост поли (А) добавляется к транскриптам, которые содержат специфическую последовательность, сигнал полиаденилирования (или поли (А)). Хвост поли (А) и связанный с ним белок помогают защитить мРНК от деградации экзонуклеазами. Полиаденилирование также является важным для терминации транскрипции, экспорта мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование происходит в ядре непосредственно после транскрипции ДНК в РНК, однако может также происходить позже в цитоплазме. После окончания транскрипции цепь мРНК расщепляется действием комплекса эндонуклеазы, связанного с РНК-полимеразой. Участок расщепления, как правило, характеризуется присутствием последовательности оснований AAUAAA возле участка расщепления. После расщепления мРНК аденозиновые остатки добавляют к свободному 3'-концу на участке расщепления.

Используемый в данном документе термин "сигнальная последовательность поли (А)" или "сигнальная последовательность полиаденилирования" представляет собой последовательность, которая запускает эндонуклеазное расщепление мРНК и добавление ряда аденозинов к 3'-концу расщепленной мРНК.

Существует несколько поли (А) сигнальных последовательностей, которые можно использовать, в том числе полученные из бычьего гормона роста (bgh) (Woychik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 81(13):3944-3948, 1984; патент США № 5122458), β -глобина мыши, α -глобина мыши (Orkin et al., EMBO J. 4(2):453-456, 1985; Thein et al., Blood 71(2):313-319, 1988), коллагена человека, вируса полиомы (Batt et al., Mol. Cell Biol. 15(9):4783-4790, 1995), гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV TK), сигнала полиаденилирования гена тяжелой цепи IgG (US 2006/0040354), гормон роста человека (hGH) (Szymanski et al., Mol. Therapy 15(7): 1340-1347, 2007), группы, состоящей из сайта поли (А) SV40, такого как позднего и раннего сайта поли (А) SV40 (Schek et al., Mol. Cell Biol. 12(12):5386-5393, 1992).

Сигнальная последовательность поли (А) может представлять собой AATAAA. Последовательность AATAAA может быть замещена другими гексануклеотидными последовательностями, гомологичными AATAAA и способными сигнализировать полиаденилирование, включая ATTAAA, AGTAAA, CATAAA, TATAAA, GATAAA, ACTAAA, AATATA, AAGAAA, AATAAT, AAAAAA, AATGAA, AATCAA, AACAAA, AATCAA, AATAAC, AATAGA, AATTAА или AATAAG (см., например, WO 06/12414).

В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли (А) может быть синтетическим сайтом полиаденилирования (см., например, вектор экспрессии pCl-neo Promega, который основан на Levitt et al., Genes Dev. 3(7): 1019-1025, 1989). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли (А) представляет собой сигнал полиаденилирования растворимого нейропилина-1 (sNRP) (AAATAAAATACGAAATG; SEQ ID NO: 11) (см., например, WO 05/073384). Дополнительные примеры сигнальных последовательностей поли (А) известны в данной области техники.

Внутренние участки посадки рибосомы (IRES).

В некоторых вариантах осуществления вектор (например, вектор аденоассоциированного вируса (AAV)), кодирующий антитело (например, тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела), антигенсвязывающий фрагмент антитела или растворимый рецептор VEGF, может содержать полинуклеотидный внутренний сайт посадки рибосомы (IRES). IRES-последовательность используются для получения более одного полипептида из одного транскрипта гена. IRES формирует сложную вторичную структуру, которая позволяет инициации трансляции происходить из любой позиции с мРНК, расположенной непосредственно ниже по ходу трансляции от того места, где находится IRES (см., например, Pelletier and Sonenberg, Mol. Cell Biol. 8(3): 1103-1112, 1988).

Специалистам в данной области техники известно несколько последовательностей IRES, включая последовательности, например, из вируса ящура (FMDV), вируса энцефаломиокардита (EMCV), ринови-

руса человека (HRV), вируса паралича крикета, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита А (HAV), вируса гепатита С (HCV) и полиовируса (PV). См., например, Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, 2002 и Hellen et al., *Genes Dev.* 15(13):1593-612, 2001.

В некоторых вариантах осуществления последовательность IRES, которая включена в вектор AAV, представляет собой последовательность 2А вируса ящура (FMDV). Последовательность вируса ящура 2А представляет собой небольшой пептид (приблизительно 18 аминокислот в длину), который, как было показано, опосредует расщепление полипротеинов (Ryan, M D et al., *EMBO* 4:928-933, 1994; Mattion et al., *J. Virology* 70:8124-8127, 1996; Furler et al., *Gene Therapy* 8:864-873, 2001 и Halpin et al., *Plant Journal* 4:453-459, 1999). Активность расщепления последовательности 2А ранее была продемонстрирована в искусственных системах, включая плазмиды и векторы генной терапии (AAV и ретровирусы) (Ryan et al., *EMBO* 4:928-933, 1994; Mattion et al., *J. Virology* 70:8124-8127, 1996; Furler et al., *Gene Therapy* 8:864-873, 2001; and Halpin et al., *Plant Journal* 4:453-459, 1999; de Felipe et al., *Gene Therapy* 6:198-208, 1999; de Felipe et al., *Human Gene Therapy* 11:1921-1931, 2000 и Klump et al., *Gene Therapy* 8:811-817, 2001).

Репортерные последовательности.

Любое из представленных в данном документе AAV может необязательно включать последовательность, кодирующую репортерный белок ("репортерную последовательность"). Неограничивающие примеры репортерных последовательностей включают последовательности ДНК, кодирующие: бета-лактамазу, бета-галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу, тимидинкиназу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), красный флуоресцентный белок, флуоресцентный белок mCherry желтый флуоресцентный белок, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT) и люциферазу. Дополнительные примеры репортерных последовательностей известны в данной области техники. При связывании с регуляторными элементами, которые управляют их экспрессией, репортерная последовательность может обеспечивать сигналы, обнаруживаемые обычными способами, включая ферментативный, рентгенографический, колориметрический, флуоресцентный или другие спектрографические исследования; анализы сортировки флуоресцентно активируемых клеток (FACS); иммунологические анализы (например, иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (RIA) и иммуногистохимию).

В некоторых вариантах осуществления репортерная последовательность представляет собой ген LacZ, и присутствие вектора, несущего ген LacZ, в клетке млекопитающего (например, в волосковой клетке улитки) детектируют с помощью анализов на активность бета-галактозидазы. Когда репортер представляет собой флуоресцентный белок (например, зеленый флуоресцентный белок) или люциферазу, присутствие вектора, несущего флуоресцентный белок или люциферазу, в клетке млекопитающего (например, в волосковой клетке улитки) может быть измерено флуоресцентными методами (например, флуоресцентной микроскопией или FACS) или продуцирование света в люцинометре (например, спектрофотометре или приборе для визуализации IVIS). В некоторых вариантах осуществления репортерную последовательность можно использовать для проверки способности к нацеливанию на тканевую специфичность и регуляторную активность тканеспецифичного промотора любого из векторов, описанных в данном документе.

Фланкирующие области, нетранслируемые области (UTR).

В некоторых вариантах осуществления любой из векторов аденоассоциированного вируса (AAV) может содержать нетранслируемый участок, такой как 5'-UTR или 3'-UTR.

Нетранслируемые области (UTR) гена транскрибируются, но не транслируются. 5' UTR начинается с места начала транскрипции и продолжается до стартового кодона, но не включает стартовый кодон. 3' UTR начинается сразу же после стоп-кодона и продолжается до сигнала завершения транскрипции. Появляется все больше данных о регуляторных ролях, которые играют UTR с точки зрения стабильности молекулы нуклеиновой кислоты и трансляции. Регуляторные признаки UTR могут быть включены в любой из векторов, композиций, наборов или способов, как описано в данном документе, для усиления экспрессии антитела (например, антитела, которое специфически связывается с VEGF), антигенсвязывающего фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с VEGF), или растворимого рецептора VEGF.

Естественная 5' UTR содержит последовательность, которая играет роль в инициации трансляции. Они содержат сигнатуры, такие как последовательности Козака, которые, как известно, участвуют в процессе, с помощью которого рибосома иницирует трансляцию многих генов. Последовательности Козака имеют консенсусную последовательность CCR (A/G) CCAUGG, где R представляет собой пурин (А или G) на три основания выше по ходу транскрипции от стартового кодона (AUG), а за стартовым кодоном следует еще один "G". Также известно, что 5' UTR образуют вторичные структуры, которые участвуют в связывании фактора элонгации.

В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR включен в любой из векторов, описанных в данном документе. Неограничивающие примеры 5'-UTR, в том числе от следующих генов: альбумин, сывороточный амилоид А, аполипопротеин А/В/Е, трансферрин, альфа-фетопроtein, эритропоэтин и фактор VIII, могут быть использованы для усиления экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, такой как мРНК.

В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR от мРНК, которая транскрибируется клеткой в улит-

ке, может быть включена в любой из описанных в данном документе векторов, композиций, наборов и способов.

3' UTR, как известно, содержат участки аденозинов и уридинов (в форме РНК) или тимидинов (в форме ДНК). Эти богатые AU сигнатуры особенно распространены в генах с высоким уровнем оборота. На основе их особенностей последовательности и функциональных свойств, богатые AU элементы (ARE) можно разделить на три класса (Chen et al., *Mol. Cell. Biol.* 15:5777-5788, 1995; Chen et al., *Mol. Cell Biol.* 15:2010-2018, 1995): ARE класса I содержат несколько рассеянных копий мотива AUUUA в областях, богатых U. Например, мРНК с-Мус и MyoD содержат ARE класса I. ARE класса II имеют два или более перекрывающихся нонамера UUAUUUA (U/A) (U/A). мРНК GM-CSF и TNF-альфа являются примерами, которые содержат ARE класса II. ARE класса III менее четко определены. Эти богатые U области не содержат мотив AUUUA. Два хорошо изученных примера этого класса представляют собой мРНК с-Jun и миогенина.

Известно, что большинство белков, связывающихся с ARE, дестабилизируют матрицу, тогда как было зарегистрировано, что члены семейства ELAV, особенно HuR, повышают стабильность мРНК. HuR связывается с ARE всех трех классов. Интеграция сайтов специфического связывания HuR в 3'-UTR молекул нуклеиновой кислоты приведет к связыванию HuR и, таким образом, к стабилизации матрицы *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления введение, удаление или модификацию 3'-UTR ARE можно использовать для модуляции стабильности мРНК, кодирующей представляющий интерес белок (например, любое антитело, описанное в данном документе, любой антигенсвязывающий фрагмент антитела, описанный в данном документе, или любой растворимый рецептор VEGF, описанный в данном документе). В других вариантах осуществления ARE могут быть удалены или мутированы для повышения внутриклеточной стабильности и, таким образом, для увеличения трансляции и продуцирования представляющего интерес белка (например, любого антитела, описанного в данном документе, любого антигенсвязывающего фрагмента антитела, описанного в данном документе, или любого растворимого рецептора VEGF, описанного в данном документе).

В других вариантах осуществления последовательности, не являющиеся ARE, могут быть включены в 5' или 3' UTR. В некоторых вариантах осуществления интроны или части интронных последовательностей могут быть включены во фланкирующие области полинуклеотидов в любом из представленных в данном документе векторов, композиций, наборов и способов. Включение интронных последовательностей может увеличивать продукцию белка, а также уровни мРНК.

Мутации Fc, которые уменьшают период полужизни антитела, фрагмента антигенсвязывающего антитела или растворимого рецептора VEGF у млекопитающего.

Любое из антител, антигенсвязывающих фрагментов антител или растворимых рецепторов VEGF, описанных в данном документе, может содержать одну или более (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять) аминокислотных замен в Fc область, которая уменьшает время полужизни антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела или растворимого рецептора VEGF у млекопитающего, например, по сравнению с периодом полужизни идентичного в остальном антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела или растворимого рецептора VEGF, не содержащего по меньшей мере одну из одной или более аминокислотных замен в области Fc. Способы определения периода полужизни антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела или растворимого рецептора VEGF у млекопитающего хорошо известны в данной области техники.

Неограничивающие примеры точечных мутаций в мутации Fc, которые могут уменьшать время полужизни антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела или растворимого рецептора VEGF, описаны в Leabman et al., *MAbs* 5(6):896-903, 2013.

Методы.

В данном документе также предложены способы, которые включают введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора аденоассоциированного вируса (AAV), который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую (а) полипептид, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела (например, любой из иллюстративных переменных доменов тяжелой цепи антитела, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе) и полипептидом, содержащим переменный домен легкой цепи антитела (например, любой из иллюстративных переменных доменов легкой цепи антитела, описанных в данном документе), функционально связанные с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе); (б) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, scFv) (например, любой из приведенных в данном документе примеров антигенсвязывающих фрагментов антитела), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе) или (с) растворимый рецептор VEGF (например, любой из растворимых рецепторов VEGF, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе). В данном документе также предложены способы повышения уровня антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела во

внутреннем ухе нуждающегося в этом млекопитающего, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую (а) полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела (например, любой из вариабельных доменов тяжелой цепи антитела, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела (например, любой из вариабельных доменов легкой цепи антитела, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом; или (б) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, scFv) (например, любой из иллюстративных антигенсвязывающих фрагментов антитела, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из описанных в данном документе иллюстративных сигнальных пептидов); при этом введение приводит к повышению (например, повышению на от 1 до 400% (или любому из поддиапазонов этого диапазона, описанных в данном документе), или к повышению на по меньшей мере 1%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 250%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 350%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 450%, по меньшей мере 500%, по меньшей мере 550%, по меньшей мере 600%, по меньшей мере 650%, по меньшей мере 700%, по меньшей мере 750%, по меньшей мере 800%, по меньшей мере 850%, по меньшей мере 900%, по меньшей мере 950%, по меньшей мере 1000%, по меньшей мере 1100%, по меньшей мере 1200%, по меньшей мере 1300%, по меньшей мере 1400%, по меньшей мере 1500%, по меньшей мере 1600%, по меньшей мере 1700%, по меньшей мере 1800%, по меньшей мере 1900% или по меньшей мере 2000%) уровня антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела во внутреннем ухе млекопитающего, например, по сравнению с уровнем антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела во внутреннем ухе млекопитающего перед введением.

В данном документе также предложены способы повышения уровня растворимого рецептора VEGF, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую растворимый рецептор VEGF (например, любой растворимый рецептор VEGF, описанный в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе); при этом введение приводит к повышению (например, повышению на от 1 до 400% (или к любому из поддиапазонов этого диапазона, описанного в данном документе), или к повышению на по меньшей мере 1%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 250%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 350%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 450%, по меньшей мере 500%, по меньшей мере 550%, по меньшей мере 600%, по меньшей мере 650%, по меньшей мере 700%, по меньшей мере 750%, по меньшей мере 800%, по меньшей мере 850%, по меньшей мере 900%, по меньшей мере 950%, по меньшей мере 1000%, по меньшей мере 1100%, по меньшей мере 1200%, по меньшей мере 1300%, по меньшей мере 1400%, по меньшей мере 1500%, по меньшей мере 1600%, по меньшей мере 1700%, по меньшей мере 1800%, по меньшей мере 1900% или по меньшей мере 2000%) уровня растворимого рецептора VEGF во внутреннем ухе млекопитающего, например, по сравнению с уровнем растворимого рецептора VEGF во внутреннем ухе млекопитающего до введения.

В данном документе также предложены способы лечения расстройства внутреннего уха у нуждающегося в этом млекопитающего, которые включают введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую: (а) полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела (например, любой из вариабельных доменов тяжелой цепи антитела, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из описанных в данном документе сигнальных пептидов) и полипептидом, содержащим вариабельный домен легкой цепи антитела (например, любым из вариабельных доменов легкой цепи антитела, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе); (б) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, любой из иллюстративных антигенсвязывающих фрагментов антитела, описанных в данном документе), связанный с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе); или (с) растворимый рецептор VEGF (например, любой из растворимых рецепторов VEGF, описанных в данном документе), функционально связанных с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе), при этом введение приводит к лечению расстройства внутреннего уха у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления лечение расстройства внутреннего уха приводит к снижению (например, снижению от 1 до 100% или любого из поддиапазонов этого диапазона, описанных в данном документе) тяжести, частоты или количества симптомов расстройства внутреннего уха у млекопитающего после введения по сравнению с ними до введения. В некоторых

вариантах осуществления лечение любого расстройства внутреннего уха приводит к повышению (например, повышению на от 1 до 400%, или любому из поддиапазонов этого диапазона, описанных в данном документе) слуха (например, одной или более метрик слуха) млекопитающего после введения по сравнению с уровнем до введения.

В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела или растворимый рецептор VEGF специфически связывается с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) (например, одним или более из VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D, например, одним или более из VEGF-A человека, VEGF-B человека, VEGF-C человека и VEGF-D человека). В некоторых вариантах осуществления любых из этих способов, вектор AAV дополнительно содержит один или оба из промотора и последовательности Козака, которые функционально связаны с последовательностью, кодирующей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит промотор, выбранный из группы, состоящей из индуцибельного промотора, конститутивного промотора и тканеспецифичного промотора. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов, вектор AAV дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов, млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов млекопитающее (например, человек) было идентифицировано как имеющее расстройство внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов, млекопитающему (например, человеку) ранее был поставлен диагноз расстройство внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов вектор включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающий фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую растворимый рецептор VEGF, функционально связанный с сигнальным пептидом.

В данном документе также предложены способы снижения активности VEGF (например, одного или более из VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D, например, одного или более из VEGF-A человека, VEGF-B человека, VEGF-C человека и VEGF-D человека) во внутреннем ухе нуждающегося в этом млекопитающего, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую (а) полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела (например, любой из вариабельных доменов тяжелой цепи антитела, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из описанных в данном документе сигнальных пептидов), и полипептид, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела (например, любой из вариабельных доменов легкой цепи антитела, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любой из сигнальных пептидов, описанных в данном документе); (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, Fab или scFv) (например, любой из антигенсвязывающих фрагментов антитела, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из описанных в данном документе сигнальных пептидов); или (c) растворимый рецептор VEGF (например, любой из растворимых рецепторов VEGF, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе), при этом полипептид согласно (a) содержит антитело, которое связывается специфически с VEGF и уменьшает активность VEGF, полипептид (b) включает антигенсвязывающий фрагмент антитела, который специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF, или растворимый рецептор VEGF согласно (c) специфически связывается с одним или более белками VEGF и снижают активность одного или более белков VEGF; и при этом введение приводит к снижению (например, снижению от 1 до 100% или любому из поддиапазонов этого диапазона, описанного в данном документе) активности VEGF (например, активности одного или более из VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D, например, одного или более из VEGF-A человека, VEGF-B человека, VEGF-C человека и VEGF-D человека) во внутреннем ухе млекопитающего, например, по сравнению с активностью VEGF у млекопитающего до введения. Снижение активности VEGF у млекопитающего может быть обнаружено с использованием любого из иллюстративных способов, описанных в данном документе.

В данном документе также предложен способы лечения акустической невралгии, вестибулярной шванномы или нейрофиброматоза II типа (NF2) во внутреннем ухе млекопитающего, которые включают: введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую (а) полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела (например, любой из вариабельных доменов тяжелой цепи антитела, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе) и полипептидом, содержащим вариабельный домен легкой цепи антитела (например, любой из вариабельных доменов легкой цепи антитела, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым

из сигнальных пептидов, описанных в данном документе); (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, Fab или scFv) (например, любой из антигенсвязывающих фрагментов антитела, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из описанных в данном документе сигнальных пептидов) или (c) растворимый рецептор VEGF (например, любой из растворимых рецепторов VEGF, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе); при этом полипептид (a) кодирует антитело, которое специфически связывается с VEGF (например, одним или более из VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D, например, одним или более из VEGF-A человека, VEGF-B человека, VEGF-C человека и VEGF-D человека) и снижает активность VEGF, полипептид согласно (b) кодирует антигенсвязывающий фрагмент антитела, который специфически связывается с VEGF (например, одним или более из VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D, например, одним или более из VEGF-A человека, VEGF-B человека, VEGF-C человека и VEGF-D человека) и снижают активность VEGF или растворимый рецептор VEGF согласно (c) специфически связывается с одним или более из VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D (например, одним или более из VEGF-A человека, VEGF-B человека, VEGF-C человека и VEGF-D человека) и при этом введение приводит к лечению акустической невралгии, вестибулярной шванномы или нейрофиброматоза II типа (NF2) во внутреннем ухе млекопитающего. Описанное в данном документе, успешное лечение одного или более из акустической невралгии, вестибулярной шванномы или нейрофиброматоза II типа может быть обнаружено путем наблюдения за уменьшением (например, уменьшение от 1 до 100%, или любого из поддиапазонов этого диапазона, описанных в данном документе) количества, тяжести или частоты одного или более симптомов акустической невралгии, вестибулярной шванномы или нейрофиброматоза II типа, соответственно, у млекопитающего, например, по сравнению с этапом предшествующим введению.

В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, кодирующий переменный домен тяжелой цепи антитела (например, любую из тяжелых цепей антитела, описанных в данном документе), и переменный домен легкой цепи антитела (например, любой из переменных доменов легкой цепи антитела, описанные в данном документе). В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, любой из антигенсвязывающих фрагментов антитела, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую растворимый рецептор VEGF (например, любой из растворимых рецепторов VEGF, описанных в данном документе), функционально связанный с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления любых из этих способов, вектор AAV дополнительно содержит один или оба из промотора и последовательности Козака, которые функционально связаны с последовательностью, кодирующей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит промотор, причем промотор выбирает из группы, состоящей из индуцибельного промотора, конститутивного промотора или тканеспецифического промотора. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов, млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов млекопитающее (например, человек) было идентифицировано как имеющее расстройство внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов, млекопитающему (например, человеку) ранее был поставлен диагноз расстройство внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов млекопитающее (например, человек) было идентифицировано как имеющее вызванную лекарственным средством потерю слуха, или ему был поставлен такой диагноз. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов млекопитающее (например, человек) было идентифицировано как имеющее связанную с возрастом потерю слуха, или ему был поставлен такой диагноз.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область Fc, которая содержит одну или более точечных мутаций, которые уменьшают время полужизни антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов две или более доз любого из векторов аденоассоциированного вируса (AAV), описанных в данном документе, вводятся или помещают во внутреннее ухо млекопитающего или субъекта. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов могут включать введение или помещение первой дозы векторов аденоассоциированного вируса (AAV) во внутреннее ухо млекопитающего или субъекта, оценку слуховой функции млекопитающего или субъекта после введения или помещения первой дозы и введение дополнительной дозы вектора аденоассоциированного вируса (AAV) во внутреннее ухо млекопитающего или субъекта, у которого обнаружено отсутствие функции слуха в пределах нормального диапазона (например, определенную с использованием любого теста на слух, известного в данной области техники).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, векто-

ры аденоассоциированного вируса (AAV) могут быть составлены для внутрикохлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, векторы аденоассоциированного вируса (AAV), описанные в данном документе, можно вводить посредством внутрикохлеарного введения или местного введения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, векторы аденоассоциированного вируса (AAV) вводят с использованием медицинского устройства (например, любого из типичных медицинских устройств, описанных в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления внутрикохлеарное введение может быть выполнено с использованием любого из способов, описанных в данном документе или известных в данной области техники. Например, вектор аденоассоциированного вируса (AAV) может быть введен или помещен в улитку с использованием следующей хирургической техники: сначала с использованием визуализации с помощью 2,5 мм жесткого эндоскопа с углом обзора 0 градусов, внешний слуховой канал очищается и круглый нож используется для четкого очертания барабанной перепонки диаметром около 5 мм. Барабанную перепонку поднимают, и осуществляют введение в среднее ухо сзади. Нервы барабанной перепонки идентифицируют и разделяют, а для удаления скутальной кости используют кюретку, обнажая мембрану круглого окна. Для улучшения апикального распределения введенного или помещенного вектора аденоассоциированного вируса (AAV) может быть использован хирургический лазер для небольшого 2-мм фенестрации в овальном окне, чтобы обеспечить смещение перилимфы во время инфузии мембраны через круглое окно вектора аденоассоциированного вируса (AAV). Затем загружают микроинфузионное устройство и доставляют в операционное поле. Устройство направляют к круглому окну, и наконечник помещают внутри костного круглого окна, чтобы обеспечить проникновение микроиглы в мембрану. Задействуют ножную педаль для обеспечения измеримой, устойчивой инфузии векторов аденоассоциированного вируса (AAV). Затем устройство извлекают, а круглое окно и стремечко заклеивают гелевой пеной.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, субъект или млекопитающее представляет собой грызуна, примата, не являющегося человеком, или человека. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, субъект или млекопитающее представляет собой взрослого, подростка, молодого человека, ребенка, малыша, младенца или новорожденного. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, субъект или млекопитающее имеет возраст 1-5, 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 1-70, 1-80, 1-90, 1-100, 1-110, 2-5, 2-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 10-30, 10-40, 10-50, 10-60, 10-70, 10-80, 10-90, 10-100, 10-110, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-100, 20-110, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-100, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90, 40-100, 50-70, 50-80, 50-90, 50-100, 60-80, 60-90, 60-100, 70-90, 70-100, 70-110, 80-100, 80-110 или 90-110 лет. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов возраст субъекта или млекопитающего составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, у субъекта или млекопитающего имеется или имеется риск развития потери слуха (например, вызванная лекарственными средствами потеря слуха).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, субъект или млекопитающее ранее были идентифицированы как имеющие мутацию в гене VEGF.

В некоторых вариантах осуществления успешное лечение потери слуха (например, вызванной лекарственными средствами потери слуха) может быть определено у субъекта с использованием любого из традиционных функциональных тестов слуха, известных в данной области техники. Неограничивающими примерами функциональных тестов слуха являются различные типы аудиометрических тестов (например, тестирование чистого тона, тестирование речи, тестирование среднего уха, слуховой ответ ствола мозга и отоакустическая эмиссия).

Способы введения любых векторов аденоассоциированного вируса (AAV), описанных в данном документе, в клетку млекопитающего известны в данной области техники (например, посредством липофекции или использования вирусного вектора, например, любого из вирусных векторов, описанных в данном документе).

Фармацевтические композиции и наборы.

В некоторых вариантах осуществления любая из композиций, описанных в данном документе, может дополнительно включать один или более агентов, которые способствуют проникновению нуклеиновой кислоты или любого из векторов, описанных в данном документе, в клетку млекопитающего (например, липосому или катионный липид).

В некоторых вариантах осуществления любой из векторов, описанных в данном документе, может быть составлен с использованием природных и/или синтетических полимеров. Неограничивающие примеры полимеров, которые могут быть включены в любую из композиций, описанных в данном документе, могут включать, без ограничения, DYNAMIC POLYCONJUGATE® (Arrowhead Research Corp., Pasadena, Calif.), составы из Minis Bio (Madison, Wis.) и Roche Madison (Madison, Wis.), полимерные составы

PhaseRX, такие как, без ограничений, SMARTT POLYMER TECHNOLOGY® (PhaseRX, Seattle, Wash.), DMRI/DOPE, полоксамер, адъювант VAXFECTIN® из Vical (San Diego, Calif.), хитозан, циклодекстрин из Calando Pharmaceuticals (Pasadena, Calif), дендримеры и полимеры молочно-гликолевой кислоты (PLGA), полимеры RONDEL™ (PHКи/олигонуклеотидная доставка наночастиц) (Arrowhead Research Corporation, Pasadena, Calif.) и pH-чувствительные сополимерные полимеры, такие как, без ограничения, полимеры, произведенные PhaseRX (Seattle, Wash.). Многие из этих полимеров продемонстрировали эффективность в доставке олигонуклеотидов *in vivo* в клетку млекопитающего (см., например, de-Fougerolles, Human Gene Ther. 19:125-132, 2008; Rozema et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 104:12982-12887, 2007; Rozema et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 104:12982-12887, 2007; Hu-Lieskovan et al., Cancer Res. 65:8984-8982, 2005; Heidel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 104:5715-5721, 2007).

Любая из композиций, описанных в данном документе, может быть, например, фармацевтической композицией. Фармацевтическая композиция может содержать любую из композиций, описанных в данном документе, и один или более фармацевтически или физиологически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей. Такие композиции могут содержать один или более буферов, таких как физиологический раствор с нейтральным буфером, физиологический раствор с фосфатным буфером и т.п.; один или более углеводов, таких как глюкоза, манноза, сахароза и декстран; маннит; один или более белков, полипептидов или аминокислот, таких как глицин; один или более антиоксидантов; один или более хелатирующих агентов, таких как ЭДТА или глутатион; и/или один или более консервантов.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель (например, забуференный фосфатом физиологический раствор, солевой раствор или бактериостатическую воду). После приготовления растворы будут вводить способом, совместимым с дозированной композицией, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводятся в виде различных лекарственных форм, таких как растворы для инъекций, гели для инъекций, капсулы для высвобождения лекарственного средства и тому подобное.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные агенты, противогрибные агенты и тому подобное, которые совместимы с фармацевтическим введением. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в любой из составов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления разовая доза любой из композиций, описанных в данном документе, может содержать общее суммарное количество по меньшей мере двух различных векторов, равное по меньшей мере 1 нг, по меньшей мере 2 нг, по меньшей мере 4 нг, около 6 нг, около 8 нг, по меньшей мере 10 нг, по меньшей мере 20 нг, по меньшей мере 30 нг, по меньшей мере 40 нг, по меньшей мере 50 нг, по меньшей мере 60 нг, по меньшей мере 70 нг, по меньшей мере 80 нг, по меньшей мере 90 нг, по меньшей мере 100 нг, по меньшей мере 200 нг, по меньшей мере 300 нг, по меньшей мере 400 нг, по меньшей мере 500 нг, по меньшей мере 1 мкг, по меньшей мере 2 мкг, по меньшей мере 4 мкг, по меньшей мере 6 мкг, по меньшей мере 8 мкг, по меньшей мере 10 мкг, по меньшей мере 12 мкг, по меньшей мере 14 мкг, по меньшей мере 16 мкг, по меньшей мере 18 мкг, по меньшей мере 20 мкг, по меньшей мере 22 мкг, по меньшей мере 24 мкг, по меньшей мере 26 мкг, по меньшей мере 28 мкг, по меньшей мере 30 мкг по меньшей мере 32 мкг, по меньшей мере 34 мкг, по меньшей мере 36 мкг, по меньшей мере 38 мкг, по меньшей мере 40 мкг, по меньшей мере 42 мкг, по меньшей мере 44 мкг, по меньшей мере 46 мкг, по меньшей мере 48 мкг, по меньшей мере 50 мкг, по меньшей мере 52 мкг, по меньшей мере 54 мкг, по меньшей мере 56 мкг, по меньшей мере 58 мкг, по меньшей мере 60 мкг, по меньшей мере 62 мкг, по меньшей мере 64 мкг, по меньшей мере 66 мкг, по меньшей мере 68 мкг, по меньшей мере 70 мкг, по меньшей мере 72 мкг, по меньшей мере 74 мкг, по меньшей мере 76 мкг, по меньшей мере 78 мкг, по меньшей мере 80 мкг, по меньшей мере 82 мкг, по меньшей мере 84 мкг, по меньшей мере 86 мкг, по меньшей мере 88 мкг, по меньшей мере 90 мкг, по меньшей мере 92 мкг, по меньшей мере 94 мкг, по меньшей мере 96 мкг, по меньшей мере 98 мкг, по меньшей мере 100 мкг, по меньшей мере 102 мкг, по меньшей мере 104 мкг, по меньшей мере 106 мкг, по меньшей мере 108 мкг, по меньшей мере 110 мкг, по меньшей мере 112 мкг, по меньшей мере 114 мкг, по меньшей мере 116 мкг, по меньшей мере 118 мкг, по меньшей мере 120 мкг, по меньшей мере 122 мкг, по меньшей мере 124 мкг, по меньшей мере 126 мкг, по меньшей мере 128 мкг, по меньшей мере 130 мкг по меньшей мере 132 мкг, по меньшей мере 134 мкг, по меньшей мере 136 мкг, по меньшей мере 138 мкг, по меньшей мере 140 мкг, по меньшей мере 142 мкг, по меньшей мере 144 мкг, по меньшей мере 146 мкг, по меньшей мере 148 мкг, по меньшей мере 150 мкг, по меньшей мере 152 мкг, по меньшей мере 154 мкг, по меньшей мере 156 мкг, по меньшей мере 158 мкг, по меньшей мере 160 мкг, по меньшей мере 162 мкг, по меньшей мере 164 мкг, по меньшей мере 166 мкг, по меньшей мере 168 мкг, по меньшей мере 170 мкг, по меньшей мере 172 мкг, по меньшей мере 174 мкг, по меньшей мере 176 мкг, по меньшей мере 178 мкг, по меньшей мере 180 мкг, по меньшей мере 182 мкг, по меньшей мере 184 мкг, по меньшей мере 186 мкг, по меньшей мере 188 мкг, по меньшей мере 190 мкг, по меньшей мере 192 мкг, по меньшей мере 194 мкг, по меньшей мере 196 мкг, по меньшей мере 198 мкг или по меньшей мере 200 мкг, например, в буферном растворе.

Композиции, предложенные в данном документе, могут быть, например, составлены так, чтобы быть совместимыми с предполагаемым путем введения. Неограничивающим примером предполагаемого пути введения является местное введение (например, внутрикохлеарное введение).

В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции содержат липидную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции содержат полимерную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции составлены так, чтобы содержать мини-кольцевую ДНК. В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции составлены так, чтобы содержать ДНК CELiD. В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции составлены так, чтобы они содержали синтетический раствор перилимфы. Иллюстративные синтетические растворы перелимфы включает 20-200 мМ NaCl; 1-5 мМ KCl; 0,1-10 мМ CaCl₂; 1-10 мМ глюкозы; 2-50 мМ HEPES, имеющие pH от около 6 до около 9.

Также предложены наборы, содержащие любую из композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать твердую композицию (например, лиофилизированную композицию, содержащую по меньшей мере два различных вектора, описанных в данном документе) и жидкость для сольюбилизации лиофилизированной композиции. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать предварительно заполненный шприц, содержащий любую из композиций, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит флакон, содержащий любую из композиций, описанных в данном документе (например, приготовленных в виде водной композиции, например, водной фармацевтической композиции).

В некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать инструкции для выполнения любого из способов, описанных в данном документе.

Устройства и хирургические способы.

В данном документе предложены терапевтические системы доставки для лечения потери слуха (например, акустической невромы/вестибулярной шванномы и связанной с этим потери слуха). В одном аспекте терапевтические системы доставки содержат i) медицинское устройство, способное создавать один или множество разрезов на мембране круглого окна внутреннего уха человека, нуждающегося в этом, и ii) эффективную дозу композиции (например, любую из композиций, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл.

В данном документе также предложены хирургические способы лечения потери слуха (например, акустической невромы/вестибулярной шванномы и ассоциированной потери слуха). В некоторых вариантах осуществления способы включают следующие этапы: осуществление в улитке человека первого разреза в первой точке разреза; и введение внутрикохлеарно терапевтически эффективного количества любой из представленных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первом месте разреза. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первый разрез или через него.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в мембрану овального окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в мембрану круглого окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, композицию вводят с использованием медицинского устройства, способного создавать множество разрезов в мембране круглого окна. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл, включающих, как правило, первый круговой аспект, где каждая микроигла имеет диаметр, по меньшей мере, около 10 мкм. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный удерживать композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество полых микроигл, индивидуально содержащих просвет, через который возможно переносить композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит средство для создания, по меньшей мере, частичного вакуума.

Далее будет подробно описано изобретение со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только в целях иллюстрации, и их не следует интерпретировать как ограничивающие, если не указано иное. Таким образом, изобретение не должно восприниматься как такое, которое ограничивается следующими примерами, оно должно восприниматься скорее как такое, которое охватывает любые и все варианты, которые станут очевидными в результате идей, представленных в данном документе.

Без дополнительного описания, полагают, что с использованием предшествующего описания и следующих ниже иллюстративных примеров специалист в данной области техники может получать и использовать композиции по данному изобретению и осуществлять на практике заявленные способы. Следующие демонстрационные примеры конкретно указывают различные аспекты данного изобретения, и их не следует интерпретировать как ограничивающие каким-либо образом остальную часть описания.

Примеры

Пример 1. Конструирование вирусных векторов.

Четыре различных рекомбинантных вектора AAV были созданы и представлены на фиг. 1A-D.

Вектор на фиг. 1A представляет собой иллюстративный вектор AAV длиной 4474 п.н. (SEQ ID NO: 35), который содержит следующие подпоследовательности, идущие в направлении от 5' до 3':

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGG
CGACSTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
AACTCCATCACTAGGGGTTCCCTGCGGCCGCACGCGT (5' ITR; SEQ ID NO: 36);

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGC
TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC
CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCC
CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT
TTATTTTTTAATTATTTTGTGCGAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCA
GGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGC
GCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGGC
GCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTT
CGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCG
CGTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC
GCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCT
CCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTG
TGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCAGCCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGG
CGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGG
GGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGT

GTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTTCGGGCTGTAACCCCCC
 CTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGT
 GCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGG
 TGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGG
 CGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTT
 TATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGC
 CGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGC
 GGCGCCGCGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCC
 TCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGG
 GGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCT
 CTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTTTTCCTACAG (последовательность CBA; SEQ
 ID NO: 37);

CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACC (спейсер; SEQ ID
 NO: 38);

ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCAC
 CAATTCT (сигнальная последовательность секрети IL-2; SEQ ID NO: 39);

GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTC
 TGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACACCTTACCAACTACGGCATGAACTGGG
 TCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTTCGGATGGATCAACACCTACACC
 GGCAGCCAACATACGCCCGGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACAC
 CAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCG
 TGTACTIONTGCGCCAAGTATCCCCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTTGACG
 TGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTTACAAAGGGCCCCAGC
 GTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGG
 TGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCCCTGGAATTCTGGCGCT
 CTGACAAGCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTIONT
 CTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
 AATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGA
 GCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGAC
 CTTCCGTGTTCTGTTTCCCTCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCC
 CTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTC
 AATTGGTACGTGGACGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGG
 AACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGAT
 TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCC
 TATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACA
 CACTGCCTCCAAGCCGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTC
 GTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCC
 AGAGAACAACACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTCCT
 GTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCT
 GCAGCGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTG

TCTCCTGGCAAG (последовательность, кодирующая тяжелую цепь бевацизумаба; SEQ ID NO: 40);

CGGAAGAGAAGA (линкерная последовательность; SEQ ID NO: 41);

GGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAG AACCCCGGACCT (последовательность T2A; SEQ ID NO: 42);

ATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGAC SAACAGC (сигнальная последовательность секрети IL-2; SEQ ID NO: 43);

GACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACA GAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTGAACTGGTATC AGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCAC TCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACC ATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACC GTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGC TCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTC TGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGAAAG TGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTC CAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCACAAAGTGTACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTG ACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTAA (последовательность, кодирующая легкую цепь бевацизумаба; SEQ ID NO: 44);

GAGCTCGCTGATCAGCCTCGA (линкерная последовательность; SEQ ID NO: 45);

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCT TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT GG (последовательность polyA хвоста бычьего гормона роста; SEQ ID NO: 46);

AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCT (линкерная последовательность; SEQ ID NO: 47) и

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (3' ITR; SEQ ID NO: 48).

Сигнальная последовательность IL-2, кодируемая каждой из SEQ ID NO: 39 и 43, представляет собой MYRMQLLSICIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 49). Последовательность T2A, кодируемая SEQ ID NO: 42, представляет собой GSGEGRSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 50). SEQ ID NO: 40 кодирует тяжелую цепь бевацизумаба (SEQ ID NO: 6). SEQ ID NO: 44 кодирует легкую цепь бевацизумаба (SEQ ID NO: 5). Последние три нуклеотида в SEQ ID NO: 44 представляют собой стоп-кодон.

Вектор на фиг. 1B представляет собой иллюстративный вектор AAV длиной 3814 п.н. (SEQ ID NO: 51), который содержит следующие подпоследовательности, идущие в направлении от 5' до 3':

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGG
CGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGGGAGTGGCC
AACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT (3' ITR; SEQ ID NO: 36);

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
TGACCGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC
CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCC
CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT
TTATTTTTTAATTATTTTGTGCGAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCA
GGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCG
GCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCG
GCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGGAGTTCGCTGCGTTGCCCTT
CGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCG
CGTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC
GCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCT
CCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTG
TGCGTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGG
CGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGG
GGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGT
GTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCC
CTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGT
GCGGGGCGTGGCGGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGG
TGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGG
CGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGGGAGCCGCAGCCATTGCCTTT
TATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGC
CGAAATCTGGGAGGCGCCCGCCACCCCCCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGC
GGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCCGC
TCCCTTCTCCCTCTCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGCTGCCTTCGGGG
GGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCT
CTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAG (последовательность CBA; SEQ
ID NO: 37);

CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACC (линкерная
последовательность; SEQ ID NO: 38);

ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCAC
CAATTCT (сигнальная последовательность секрети IL-2; SEQ ID NO: 39);

GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTC
TGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGG

TCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGGATGGATCAACACCTACACC
GGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACAC
CAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCG
TGTACTIONACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACG
TGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGC
GTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGC
TGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCT
CTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCT
CTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGA
GCTGCGACAAGACCCACACCGGCAAG (последовательность, кодирующая тяжелую
цепь ранибизумаба; SEQ ID NO: 52);

CGGAAGAGAAGA (линкерная последовательность; SEQ ID NO: 41);

GGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAG
AACCCCGGACCT (последовательность T2A; SEQ ID NO: 42);

ATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTGCAATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGAC
CAACAGC (сигнальная последовательность секрета IL-2; SEQ ID NO: 43);

GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGACTTGTTC AACCTGGCGGCTCTC
TGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGG
TCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGGATGGATCAACACCTACACC
GGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACAC
CAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCG
TGTACTIONACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACG
TGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGC
GTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGC
TGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCT
CTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCT
CTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGA
GCTGCGACAAGACCCACACCGGCAAG (последовательность, кодирующая легкую цепь
ранибизумаба; SEQ ID NO: 53);

GAGCTCGCTGATCAGCCTCGA (линкерная последовательность; SEQ ID NO: 45);

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCT
TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT
CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC
AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
GG (последовательность polyA хвоста бычьего гормона роста; SEQ ID NO: 46) и

AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCT (линкер; SEQ ID NO: 47);

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGTCTGCTC
ACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC
AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 48).

Сигнальная последовательность IL-2, кодируемая каждой из SEQ ID NO: 39 и 43, представляет собой MYRMQLLSIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 49). Последовательность T2A, кодируемая SEQ ID NO: 42, представляет собой GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 50). SEQ ID NO: 52 кодирует тяжелую цепь ранибизумаба

(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGVWINTYTG
EPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVW
GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
GK; SEQ ID NO: 54).

SEQ ID NO: 53 кодирует легкую цепь бевацизумаба (SEQ ID NO: 7).

Последние три нуклеотида в SEQ ID NO: 53 представляют собой стоп-кодон.

Фиг. 1С представляет собой иллюстративный вектор AAV длиной 4573 п.н. (SEQ ID NO: 55), который содержит следующие подпоследовательности, идущие в направлении от 5' до 3':

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCCGGG
CGACCTTTGGTGCCTCGCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
AACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT (5' ITR; SEQ ID NO: 36);

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
TGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAACTGCC
CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCC
CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT
TTATTTTTTAATTATTTTGTGTCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCA
GGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGCG
GCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCG
GCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGGCGGGAGTTCGCTGCGTTGCCTT
CGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCG
CGTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC
GCTTGGTTAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCT
CCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTG
TGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCAGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGG
CGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGG
GGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAGGCTGCGTGCGGGGTGT
GTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCC
CTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGT
GCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGG
TGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGG

CAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACG
AGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTG
ACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT (последовательность, кодирующая легкую
цепь ранибизумаба; SEQ ID NO: 56);

GGCTCCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTGAGGAG
AATCCTGGCCCA (линкерная последовательность; SEQ ID NO: 57);

ATGGAGAGCGACGAGAGCGGCCTGCCCGCCATGGAGATCGAGTGCCGCATC
ACCGGCACCTGAACGGCGTGGAGTTCGAGCTGGTGGGCGGCGAGAGGGCACCCC
CGAGCAGGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGCACCAAAGGCGCCCTGACCTTCA
GCCCCACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACC
CCAGCGGCTACGAGAACCCCTTCCTGCACGCCATCAACAACGGCGGCTACACCAAC
ACCCGCATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCGTGTGCACGTGAGCTTCAGCTACCG
CTACGAGGCCGCGCGTGTATCGGCGACTTCAAGGTGATGGGCACCGGCTTCCCCG
AGGACAGCGTGATCTTACCGACAAGATCATCCGCAGCAACGCCACCGTGGAGCAC
CTGCACCCCATGGGCGATAACGATCTGGATGGCAGCTTACCCGCACCTTCAGCCTG
CGCGACGGCGGCTACTACAGCTCCGTGGTGGACAGCCACATGCACTTCAAGAGCGC
CATCCACCCAGCATCTGCAGAACGGGGGCCCATGTTCCGCTTCCGCCGCGTGGA
GGAGGATCACAGCAACACCGAGCTGGGCATCGTGGAGTACCAGCACGCCTTCAAGA
CCCCGGATGCAGATGCCGGTGAAGAATAA (последовательность, кодирующая
TurboGFP; SEQ ID NO: 58);

GAGCTCGCTGATCAGCCTCGA (линкерная последовательность; SEQ ID NO: 45);

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCT
TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT
CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC
AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
GG (последовательность polyA хвоста бычьего гормона роста; SEQ ID NO: 46);

AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCT (линкерная
последовательность; SEQ ID NO: 47) и

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
ACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC
AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (3' ITR; SEQ ID NO: 48).

Сигнальная последовательность IL-2, кодируемая каждой из SEQ ID NO: 39 и 43,
представляет собой MYRMQLLSICIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 49). Последовательность
T2A, кодируемая SEQ ID NO: 42, представляет собой GSGEGRSLLTCGDVEENPGP
(SEQ ID NO: 50). SEQ ID NO: 52 кодирует тяжелую цепь ранибизумаба (SEQ ID NO: 54).
SEQ ID NO: 56 кодирует легкую цепь бевацизумаба (SEQ ID NO: 7). SEQ ID NO: 58
кодирует TurboGFP

(MESDEGLPAMEIECRITGTLNGVEFELVGGEGTPEQGRMTNKMKSTKGALTFSPYLL
SHVMGYGFYHFGTYPSGYENPFLHAINNGGYTNTRIEKYEDGGVLHVSFSYRYEAGRVI
GDFKVMGTGFPEDSVIFTDKIIRSNAATVEHLHPMGDNDLDGSFTRTFSLRDGGYYSSVV
DSHMHFKSAIHPSILQNGGPMFAFRRVEEDHSNTELGIVEYQHAFKTPDADAGEE; SEQ
ID NO: 59).

Последние три нуклеотида в SEQ ID NO: 58 представляют собой стоп-кодон.

Фиг. 1D представляет собой иллюстративный вектор AAV длиной 3631 п.н. (SEQ ID NO: 60), кото-
рый содержит следующие подпоследовательности, идущие в направлении от 5' до 3':

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGG
CGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTTGCC
AACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT (5' ITR; SEQ ID NO: 36);

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
TGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC
CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCC
CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT
TTATTTTTTAATTATTTTGTGTCAGCGATGGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCA
GGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCG
GCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCG
GCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTT
CGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCG
CGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC
GCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCT
CCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTG
TGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGG
CGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGG
GGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGT
GTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGGCGGTGCGGGCTGTAACCCCC
CTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGT
GCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGG
TGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGG
CGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGGGAGCCGAGCCATTGCCTTT
TATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGC
CGAAATCTGGGAGGCGCCCGCACCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGC
GGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCG
TCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGCTGCCTTCGGGG
GGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCT
CTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAG (последовательность CBA; SEQ
ID NO: 37);

CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACC (спейсер; SEQ ID

NO: 38);

ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCAC
СААТТСТ (сигнальная последовательность секреции IL-2; SEQ ID NO: 39);

AGCGATACCGGCAGACCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCA
TCCACATGACCGAGGGCAGAGAGCTGGTCATCCCCTGCAGAGTGACAAGCCCCAAC
ATCACCGTGA CTCTGAAGAAGTTCCTCTGGACACACTGATCCCCGACGGCAAGAG
AATCATCTGGGACAGCCGGAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAAGAGA
TCGGCCTGCTGACCTGTGAAGCCACCGTGAATGGCCACCTGTACAAGACCAACTACC
TGACACACAGACAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCTAGCCACGGC
ATTGAACTGTCTGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGTACCGCCAGAACCGAGCT
GAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGA
AACTGGTCAACCGGGACCTGAAAACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAATTCCTG
AGCACCCCTGACCATCGACGGCGTGACCAGATCTGACCAGGGCCTGTACACATGTGC
CGCCAGCTCTGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCACCTTCGTGCGGGTGCACGAGA
AGGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGA ACTGCTCGGCGGACCTT
CCGTGTTCTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTG
AAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCC GAAGTGAAGTTCAAT
TGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAAC
AGTACAATAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGG
CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTAT
CGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACAC
TGCCCTCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTC
AAGGGCTTCTACCCTTCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGA
GAACA ACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTA
CAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCA
GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTC
CTGGATAA (последовательность, кодирующая афлиберцепт; SEQ ID NO: 61);

GAGCTCGCTGATCAGCCTCGA (линкерная последовательность; SEQ ID NO: 45);

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCT
TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT
CGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC
AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
GG (последовательность polyA хвоста бычьего гормона роста; SEQ ID NO: 46);

AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCT (линкерная
последовательность; SEQ ID NO: 47) и

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC
AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (3' ITR; SEQ ID NO: 48).

Сигнальная последовательность IL-2, кодируемая SEQ ID NO: 39, представляет собой MYRMQLL-
SCIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 49). SEQ ID NO: 61 кодирует афлиберцепт (SEQ ID NO: 12). Последние
три нуклеотида в SEQ ID NO: 61 представляют собой стоп-кодон.

Для определения экспрессии белка, управляемого векторами AAV, показанными на фиг. 1A-1C,
клетки HEK293FT культивировали в течение ночи в количестве 7×10^4 клеток/лунка (400 Тл на лунку) в
лунках 24-луночного планшета. Клетки HEK293FT трансфицировали при ~ 800 нг с помощью векторов
AAV, показанных на фиг. 1A-1D, с использованием реактива Jetprime Polypus (использовался для полу-
чения данных на дорожках 2-5 и 10-13 на фиг. 2). Клетки HEK293FT также культивировали в течение
шести часов в количестве 4×10^4 клеток/лунка (50 Тл на лунку) в лунках 96-луночного планшета в при-
сутствии 2 мкМ эпопозида (использовался для получения данных на дорожках 6-8 и 14-16 на фиг. 2).
Вектор AAV, показанный на фиг. 1A, добавляли в среду с множественностью заражения (MOI), равной

$7,5 \times 10^4$, $2,2 \times 10^5$ или $5,5 \times 10^5$. Супернатант собирали из лунки через 72 ч после обработки и загружали в 4-12% белковый гель Volt в восстанавливающих (дорожки 2-8 на фиг. 2) и невосстанавливающих условиях (дорожки 10-16 на фиг. 2). Антитело против ранибизумаба, детектирующее область Fab, использовали в качестве первичного антитела, а антитело против IgG человека использовали в качестве вторичного антитела.

Как показано на фиг. 2, тяжелые цепи и легкие цепи ранибизумаба были обнаружены на дорожках 3 и 6-8, а интактный ранибизумаб (гетеродимер) был обнаружен на дорожках 11 и 14-16.

Пример 2. Связывающая активность моноклональных антител против VEGF человека.

Был проведен ряд экспериментов для определения активности связывания бевацизумаба, продуцируемого в клетках HEK293FT после трансфекции вектором AAV, показанным на фиг. 1А. Первый набор контрольных экспериментов был выполнен для калибровки инструментов плазмонного поверхностного резонанса (с использованием мышинового моноклонального антитела против VEGF человека (MmAb против hVEGF; R&D, MAB293-100) в буфере или в кондиционированной среде (фиг. 3А и 3В, соответственно) с использованием рекомбинантного VEGF человека в качестве связывающего агента. Второй набор экспериментов был выполнен для определения VEGF-связывающей активности человека в контрольной кондиционированной среде и кондиционированной среде из клеток HEK293TF после трансфекции вектором AAV, показанным на фиг. 1А (фиг. 4А и 4В, соответственно).

Образцы, бевацизумаб в среде из клеток HEK293TF, трансфицированных вектором AAV, показанным на фиг. 1А, или кондиционированной среде), готовили разбавлением 1:10 в 1-кратном кинетическом буфере (Fortebio, 18-1105) в 384-луночный планшет для образцов. MmAb против hVEGF (R&D, MAB293-100) разводили до концентрации 10 мкг/мл в качестве положительного контроля. Агент захвата, рекомбинантный VEGF человека (R&D, 293-VE-010), серийно разводили с соотношением разведений 1:2 от 200 нМ до 3,125 нМ.

Аффинность связывания образцов кондиционированной среды и мышинных антител против VEGF человека (R&D) измеряли в буфере кинетики 1× на биосенсорном приборе Octet® HTX. Обязательные особенности и значения K_D были получены с помощью программного обеспечения для анализа Octet®, Data Analysis HT10.0. Как показано на фиг. 3А, В, K_D MmAb против hVEGF в буфере составляла $<1,0 \times 10^{-12}$ М, а MmAb против hVEGF в кондиционированной среде составляла $<1,0 \times 10^{-12}$ М. Сама кондиционированная среда не имела аффинности связывания и имела очень низкую интенсивность (только фоновый сигнал) (фиг. 4А). Напротив, кондиционированная среда, содержащая бевацизумаб, продуцируемый клетками HEK293TF, трансфицированными вектором AAV, показанным на фиг. 1А, имела высокую аффинность связывания, но низкую интенсивность (фиг. 4В; $K_D < 1,0 \times 10^{-12}$ М). На фиг. 4С показана таблица образцов загрузки и соответствующих ошибок K_D , K_D , константа равновесной ассоциации (k_a), и диссоциации ($k_{дис}$), и ошибка $k_{дис}$.

Таким образом, мышинное антитело против hVEGF (R&D) продемонстрировало высокую аффинность связывания (K_D была ниже, чем измеримый диапазон $1,0 \times 10^{-12}$ М). Образец кондиционированной среды с бевацизумабом продемонстрировал высокую аффинность связывания (K_D была ниже измеряемого диапазона). Никакое значение K_D не могло быть экстраполировано из данных связывания образца контрольной кондиционированной среды.

В целом, эти данные показывают, что векторы AAV, представленные в данном документе, могут приводить к экспрессии и секреции антител против VEGF и могут использоваться для экспрессии антител против VEGF во внутреннем ухе млекопитающего.

Другие варианты осуществления изобретения

Следует понимать, что, хотя изобретение описано в связи с его подробным описанием, приведенное выше описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в рамках объема следующей формулы изобретения.

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Заголовки разделов и любые описания материалов, способов и примеров являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий нуклеотидную последовательность, которая содержит:

(i) первую кодирующую последовательность, которая кодирует первый полипептид, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с первым сигнальным пептидом, и вторую кодирующую последовательность, которая кодирует второй полипептид, содержащий переменный домен легкой цепи антитела, функционально связанный со вторым сигнальным пептидом,

где первая кодирующая последовательность по меньшей мере на 96% идентична SEQ ID NO: 52, и

- вторая кодирующая последовательность по меньшей мере на 96% идентична SEQ ID NO: 53; и
- (ii) одну или более последовательностей, кодирующих пептид T2A, и где полипептиды специфически связываются с одним или более белков VEGF млекопитающих.
2. Вектор AAV по п.1, в котором нуклеотидная последовательность дополнительно содержит один или оба из (i) промотора и (ii) последовательности Козак.
3. Вектор AAV по п.2, в котором промотор представляет собой индуцибельный промотор, конститутивный промотор или тканеспецифичный промотор.
4. Вектор AAV по п.2 или 3, в котором промотор представляет собой промотор CAG, промотор CBA или промотор CMV.
5. Вектор AAV по п.4, где промотор содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 37.
6. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором нуклеотидная последовательность дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования.
7. Вектор AAV по п.6, в котором сигнальная последовательность полиаденилирования содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 46.
8. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором нуклеотидная последовательность содержит:
- (i) последовательность согласно SEQ ID NO: 52 и
- (ii) последовательность согласно SEQ ID NO: 53.
9. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, где полипептиды содержат:
- (i) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8 или 54 и
- (ii) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7.
10. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором полипептиды представляют собой ранибизумаб.
11. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором нуклеотидная последовательность содержит в порядке от 5' до 3' последовательности согласно SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 53.
12. Вектор по любому из предшествующих пунктов, в котором один или оба из первого и второго сигнальных пептидов содержат сигнальную последовательность секреции IL-2.
13. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором нуклеотидная последовательность дополнительно содержит два инвертированных концевых повтора (ITR) AAV, где два ITR AAV фланкируют кодирующие последовательности и промотор.
14. Вектор AAV по п.13, в котором два ITR AAV представляют собой или получены из ITR AAV2.
15. Вектор AAV по п.13 или 14, в котором два ITR AAV содержат:
- (i) 5' ITR, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 36, и
- (ii) 3' ITR, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 48.
16. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор AAV по любому из пп.1-15.
17. Фармацевтическая композиция по п.16, где фармацевтическая композиция содержит один или более фармацевтически приемлемых наполнителей.
18. Композиция по п.16 или 17, в которой композиция составлена для введения во внутреннее ухо.
19. Клетка, содержащая вектор AAV по любому из пп.1-15.
20. Клетка по п.19, в которой клетка представляет собой клетку внутреннего уха человека.
21. Способ повышения уровня антигенсвязывающего фрагмента антитела, который специфически связывается с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), включающий:
- введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV по любому из пп.1-15 или композиции по любому из пп.16-18.
22. Способ снижения активности VEGF во внутреннем ухе нуждающегося в этом млекопитающего, включающий:
- введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV по любому из пп.1-15 или композиции по любому из пп.16-18.
23. Способ по п.21 или 22, в котором млекопитающее имеет нарушение внутреннего уха, характеризующееся неправильной работой одной или более клеток во внутреннем ухе млекопитающего или вокруг него, или ему был поставлен такой диагноз.
24. Способ лечения расстройства внутреннего уха у нуждающегося в этом млекопитающего, включающий введение во внутреннее ухо млекопитающего терапевтически эффективного количества вектора AAV по любому из пп.1-15 или композиции по любому из пп.16-18, где нарушение внутреннего уха характеризуется неправильной работой одной или более клеток во внутреннем ухе млекопитающего или вокруг него.
25. Способ по любому из пп.21-24, где введение вектора AAV увеличивает уровень первого и второго полипептидов во внутреннем ухе млекопитающего, где:
- (i) первый полипептид содержит варибельный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с первым сигнальным доменом; и
- (ii) второй полипептид содержит варибельный домен легкой цепи антитела, функционально свя-

занный со вторым сигнальным доменом, и

где первый и второй полипептиды специфически связываются с одним или более белками VEGF млекопитающего.

26. Способ по п.25, где введение вектора AAV снижает активность VEGF во внутреннем ухе млекопитающего.

27. Способ по п.26, где снижение активности VEGF во внутреннем ухе млекопитающего детектируют путем обнаружения снижения количества, тяжести или частоты одного или более симптомов расстройства внутреннего уха.

28. Способ по любому из пп.21-27, где нарушение внутреннего уха представляет собой вестибулярную шванному.

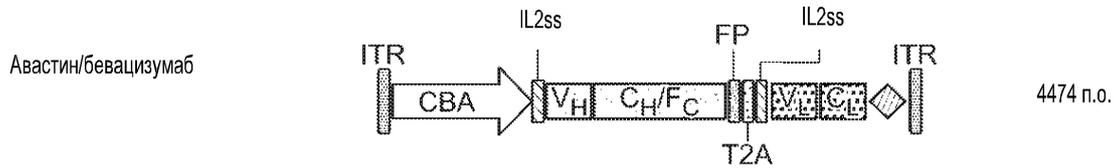
29. Способ по любому из пп.21-27, где нарушение внутреннего уха представляет собой нейрофиброматоз 2-го типа.

30. Способ по любому из пп.21-29, где млекопитающее представляет собой человека.

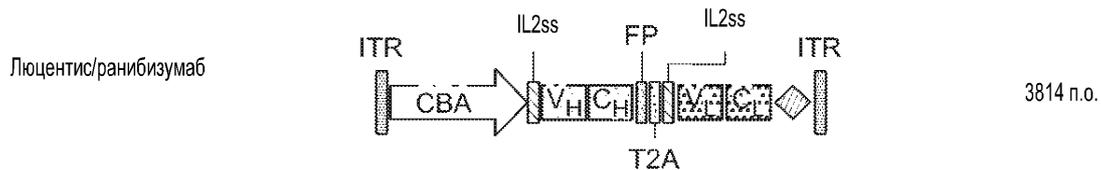
31. Набор для повышения уровня антигенсвязывающего фрагмента антитела во внутреннем ухе нуждающегося в этом млекопитающего, отличающийся тем, что набор содержит вектор AAV по любому из пп.1-15.

32. Способ по любому из пп.23-30, где одна или более клеток во внутреннем ухе или вокруг него содержит: волосковые клетки, опорные клетки, нейроны спирального ганглия, макрофаги, клетки Шванна или их любую комбинацию.

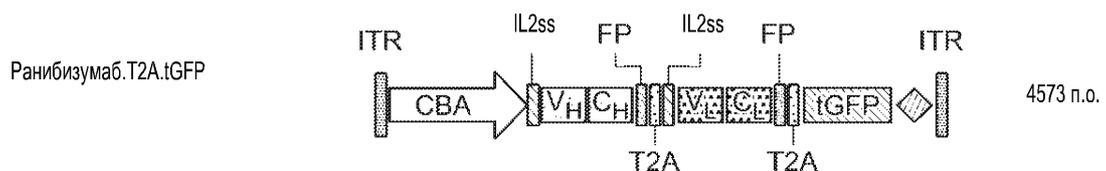
33. Способ по п.32, где волосковые клетки представляют собой внутренние волосковые клетки.



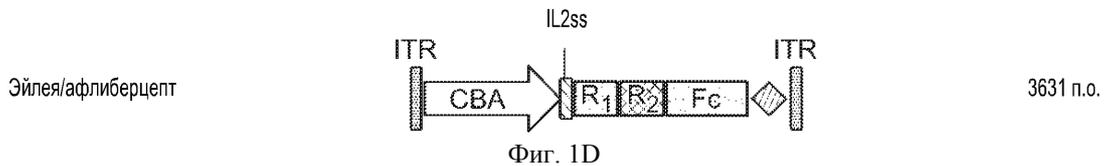
Фиг. 1А



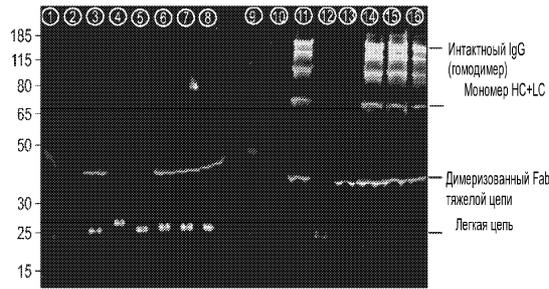
Фиг. 1В



Фиг. 1С



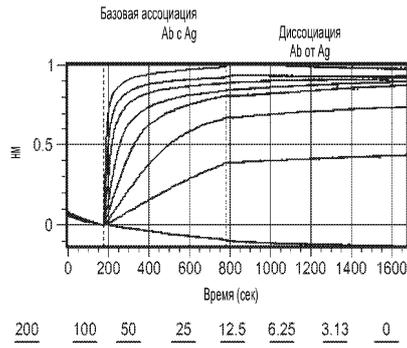
Фиг. 1D



- | | | | |
|--|---------------------------|---|-----------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Предварительно окрашенный набор маркерных белков PageRuler 2. Нетрансфицированный - отрицательный контроль 3. рITR.CBA.бевацизумаб 4. рITR.CBA.люцентис.T2A.tGFP 5. рITR.CBA.люцентис 6. MOI апс80AAP.CBA.бевацизумаб, равная 7,5E4 7. MOI апс80AAP.CBA.бевацизумаб, равная 2,2E5 8. MOI апс80AAP.CBA.бевацизумаб, равная 5,5E5 9. Предварительно окрашенный набор маркерных белков PageRuler | Восстанавливающие условия | <ol style="list-style-type: none"> 10. Нетрансфицированный - отрицательный контроль 11. рITR.CBA.бевацизумаб 12. рITR.CBA.люцентис.T2A.tGFP 13. рITR.CBA.люцентис 14. MOI апс80AAP.CBA.бевацизумаб, равная 7,5E4 15. MOI апс80AAP.CBA.бевацизумаб, равная 2,2E5 16. MOI апс80P.CBA.бевацизумаб, равная 5,5E5 | Невосстанавливающие условия |
|--|---------------------------|---|-----------------------------|

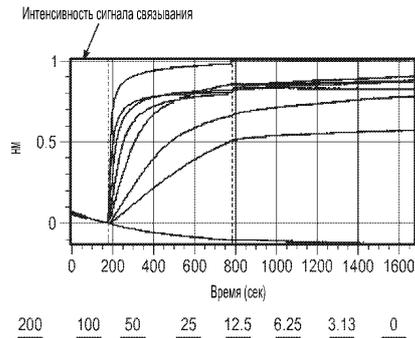
Фиг. 2

MmAb против hVEGF (R&D, MAB293-100)



Фиг. 3А

MmAb против hVEGF (R&D, MAB293-100) в CM*

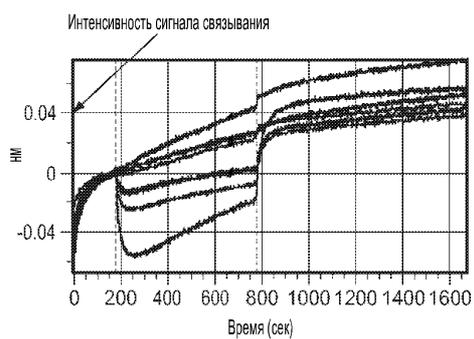


*MmAb против hVEGF готовили в KM в концентрации 100 мкг/мл, затем разбавляли до конечной концентрации 10 мкг/мл в 1х кинетическом буфере.

Фиг. 3В

046796

Родительский

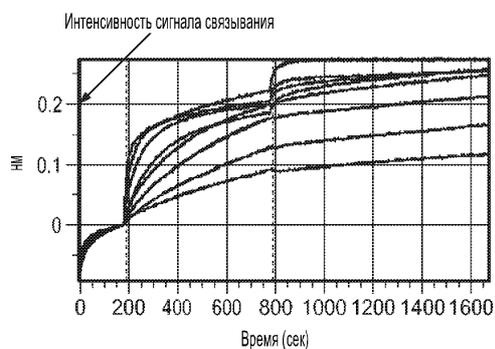


200 100 50 25 12.5 6.25 3.13 0

Без аффинности связывания, очень низкая
интенсивность, только фон

Фиг. 4А

Бевацизумаб



200 100 50 25 12.5 6.25 3.13 0

Высокая аффинность связывания, но низкая интенсивность

Фиг. 4В

ID загруженного образца	KD(M)	Ошибка KD	ka (1/мс)	Ошибка ka	кдис (1/с)	Ошибка кдис
MmAb против hVEGF	<1,0E-12	<1,0E-12	2,32E+05	7,60E+02	<1,0E-07	1,34E-07
MmAb против hVEGF в CM	<1,0E-12	<1,0E-12	2,86E+05	8,54E+02	<1,0E-07	1,27E-07
Бевацизумаб	<1,0E-12	1,32E-12	1,62E+05	1,43E+03	<1,0E-07	2,14E-07
Родительский	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д

Фиг. 4С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2