

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490539** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.08.30

(22) Дата подачи заявки
2018.12.19

(51) Int. Cl. *C12N 15/861* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

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

(31) **62/607,665**

(32) **2017.12.19**

(33) **US**

(62) **202091509; 2018.12.19**

(71) Заявитель:
АКУОС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) 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 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.

A1

202490539

202490539

A1

AAV-ОПОСРЕДОВАННАЯ ДОСТАВКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ВО ВНУТРЕННЕЕ УХО

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Данная заявка 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 переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом и полипептид, содержащий переменный 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 переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий переменный 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 переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий переменный 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 (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, связанный с сигнальным пептидом; при этом полипептид согласно (а) кодирует антитело, которое специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF, полипептид согласно (б) 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 (а) 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 невромы, 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 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, 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 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 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 тканеспецифического 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), функционально 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 невралгии, 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 невралгии, 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 тканеспецифического 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 невралгию, 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 секрети.

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 «трандуцированный» относится к процессу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку. «Трансфицированная», «трансформированная», или «трандуцированная» клетка млекопитающего представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трандуцирована 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 последовательностями. 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 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (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 неврому, нейрофиброматоз 2-го типа, слуховую невропатию, 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 нисходящий 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 (MOI), равной $7,5 \times 10^4$. Дорожка 7: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1А, с MOI, равной $2,2 \times 10^5$. Дорожка 8: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1А, с MOI, 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 (MOI), равной $7,5 \times 10^4$. Дорожка 15: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1А, с MOI, равной $2,2 \times 10^5$. Дорожка 16: трансфекция вектором AAV, представленным на фиг. 1А, с MOI, 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 (CM) 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 CM 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 (b) 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 сигнальным пептидом; или (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, Fab или scFv), функционально связанный с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к повышению уровня антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела во внутреннем ухе млекопитающего.

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 переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий переменный 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 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 (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; при этом полипептид согласно (а) кодирует антитело, которое специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF, полипептид согласно (б) кодирует антигенсвязывающий фрагмент антитела, который специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF; и при этом введение приводит к снижению активности VEGF во внутреннем ухе млекопитающего.

В данном документе также предложены способы лечения акустической невралгии, вестибулярной шванномы, нейрофиброматоза II типа во внутреннем ухе 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 сигнальным пептидом; или (б) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, Fab или scFv), функционально связанный с сигнальным пептидом; при этом полипептид согласно (а) кодирует антитело, которое специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF, полипептид согласно (б) кодирует антигенсвязывающий фрагмент антитела, который специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF; и при этом введение приводит к лечению акустической невралгии или вестибулярной шванномы во внутреннем ухе млекопитающего.

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

В данном документе также предложены способы лечения акустической невралгии, 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 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, κλ-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, КИИ IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, DVI-IgG, нанотело, нанотело-ЧСА, диатело, TandAb, оцдиатело, оцдиатело-СНЗ, диатело-СНЗ, триатело, миниантитело, минитело, минитело TriBi, scFv-СНЗ КИИ, Fab-scFv, scFv-СН-CL-scFv, F(ab')₂-scFv₂, scFv-КИИ, 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 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 переменный домен антитела, который можно найти у верблюжьих. Домен V_{NAR} представляет собой единственный мономерный переменный 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; Muyltermans, *J. Biotechnol.* 74:277-302, 2001; Muyltermans et al., *Trends Biochem. Sci.* 26:230-235, 2001; Muyltermans, *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 переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи.

Фрагмент «Fab» содержит константный домен легкой цепи и первый константный

домен (C_{H1}) тяжелой цепи, в дополнение к переменным доменам тяжелой и легкой цепи фрагмента F_v.

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

Термин «иммуноглобулин с двумя переменными 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 0,5×10⁻⁵ М, менее чем 1×10⁻⁶ М, менее чем 0,5×10⁻⁶ М, менее чем 1×10⁻⁷ М, менее чем 0,5×10⁻⁷ М, менее чем 1×10⁻⁸ М, менее чем 0,5×10⁻⁸ М, менее чем 1×10⁻⁹ М, менее чем 0,5×10⁻⁹ М, менее чем 1×10⁻¹⁰ М, менее чем 0,5×10⁻¹⁰ М, менее чем 1×10⁻¹¹ М, менее чем 0,5×10⁻¹¹ 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 0,5×10⁻⁵ М, около 1×10⁻⁶ М, около 0,5×10⁻⁶ М, около 1×10⁻⁷ М, около 0,5×10⁻⁷ М, около 1×10⁻⁸ М, около 0,5×10⁻⁸ М, около 1×10⁻⁹ М, около 0,5×10⁻⁹ М, около 1×10⁻¹⁰ М, около 0,5×10⁻¹⁰ М, около 1×10⁻¹¹ М или около 0,5×10⁻¹¹ М (включительно); около 0,5×10⁻¹¹ М до около 1×10⁻⁵ М, около 0,5×10⁻⁵ М, около 1×10⁻⁶ М, около 0,5×10⁻⁶ М, около 1×10⁻⁷ М, около 0,5×10⁻⁷ М, около 1×10⁻⁸ М, около 0,5×10⁻⁸ М, около 1×10⁻⁹ М, около 0,5×10⁻⁹ М, около 1×10⁻¹⁰ М, около 0,5×10⁻¹⁰ М, или около 1×10⁻¹¹ М (включительно); около 1×10⁻¹¹ М до около 1×10⁻⁵ М, около 0,5×10⁻⁵ М, около 1×10⁻⁶ М, около 0,5×10⁻⁶ М, около 1×10⁻⁷ М, около 0,5×10⁻⁷ М, около 1×10⁻⁸ М, около 0,5×10⁻⁸ М, около 1×10⁻⁹ М, около 0,5×10⁻⁹ М, около 1×10⁻¹⁰ М или около 0,5×10⁻¹⁰ М (включительно); около 0,5×10⁻¹⁰ М до около 1×10⁻⁵ М, около 0,5×10⁻⁵ М, около 1×10⁻⁶ М, около 0,5×10⁻⁶ М, около 1×10⁻⁷ М, около 0,5×10⁻⁷ М, около 1×10⁻⁸ М, около 0,5×10⁻⁸ М, около 1×10⁻⁹ М, около 0,5×10⁻⁹ М или около 1×10⁻¹⁰ М (включительно); около 1×10⁻¹⁰ М до около 1×10⁻⁵ М, около 0,5×10⁻⁵ М, около 1×10⁻⁶ М, около 0,5×10⁻⁶ М, около 1×10⁻⁷ М, около 0,5×10⁻⁷ М, около 1×10⁻⁸ М, около 0,5×10⁻⁸ М, около 1×10⁻⁹ М, около 0,5×10⁻⁹ М или около 1×10⁻¹⁰ М (включительно); около 0,5×10⁻⁹ 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, или около $0,5 \times 10^{-8}$ 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 3-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 в области Fc.

VEGF

Ген VEGF кодирует фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ранее известный как fms-подобная тирозинкиназа (Flt-1). Белок VEGF представляет собой гепаринсвязывающий 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 SGAARSASSGREEPQPEEGEEEEEEKEEERGPQWRLG
 ARKPGSWTGEAAVCADSAPAARAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGSAS
 RAGPGRASET MNFLLSWVHWSLALLLYLH HAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFM DV
 YQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFK PSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPT EESNITMQIM
 RIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKKGKQKRKRKKSRYKSWS
 VYVGARCC LMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNE
 RTCRC DKPRR

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

ct gacggacaga cagacagaca ccgccccag cccagctac cacctctcc cggccggcg gcggacagtg
 gacgcggcgg cgagccgcgg gcaggggccc gagcccgcgc ccggaggcgg ggtggagggg gtcggggctc
 gcggcgctgc actgaaactt ttcgtccaac ttctgggctg ttctcgctc ggaggagccg tggctccgcg
 gggggaagccgagccgagcg gagccgcgag aagtgctagc tggggccggg aggagccgca gccggaggag ggggaggagg
 aagaagaaa ggaagaggag agggggcccgc agtggcgact cggcgctcgg aagccgggct catggagggg tgaggcggcg
 gtgtgcgag acagtgtcc agccgcgcgc gctccccagg ccctggccc ggcctcgggc cggggaggaa gtagtctcg
 ccgaggcggc gaggagagcg ggccgcccc cagcccgagc cggagagggg ggcgagccg cgccggcccc ggtcgggct
 ccgaaacct gaactttctg ctgtcttggg tgcattggag cctgccttctgctctacc tccacctgc caagtgtcc caggctgcac
 ccatggcaga aggaggaggg cagaatcatc acgaagtggg gaagttcatg gatgtctate agcgcagcta ctgccatcca
 atcgagacc tggtggacat cttccaggag tacctgatg agatcgagta catctcaag ccatcctgtg tgcccctgat
 gcgatgcggg ggctgctgca atgacgaggg cctggagtgt gtgcccactg aggagtcaa catcaccatg cagattatgc
 ggatcaaacc tcaccaaggc cagcacatag gagagatgag cttctacag cacaacaaat gtgaatgcag accaaagaaa
 gatagagcaa gacaagaaa aaaatcagtt cgaggaaagg gaaaggggca aaaacgaaag cgcaagaaat cccggtataa
 gtctggagc gtgtacgttg gtgcccgtg ctgtctaag ccctggagcc tcctggccc ccatcctgt gggccttct
 cagagcggag aaagcatttg tttgtacaag atccgcagac gtgtaaatgt tctgcaaaa acacagactc gcgttgcaag
 gcgaggcagc ttgagttaaa cgaacgtact tgcagatgtg acaagccgag gcggtga

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

MTDRQTD TAPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALK
 LFVQLLGC SRFGGAVVRAGEAEP SGAARSASSGREEPQPEEGEEEEKEEERGPQWRLG
 ARKPGSWTGEAAVCADSAPAARAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGSAS
 RAGPGRASET MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDV
 YQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIM
 RIKPHQGQHIGEMSFLQH NKCECRPKKDRARQEKKSVRGKKGKQKRKRKKS RPCGPCS
 ERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

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

ct gacggacaga cagacagaca ccgccccag cccagctac cacctctcc cggccggcg gcgacagtg
 gacgcggcgg cgagccggg gcaggggccc gagcccgcc cggaggcgg ggtggagggg gtcggggctc
 gcggcgtcgc actgaaactt ttcgtccaac ttctgggctg ttctcgctc ggaggagccg tggcgcgcg
 gggggaagccgagccgagcg gagccgagc aagtgctagc tcgggcccggg aggagccgca gccggaggag ggggaggagg
 aagaagagaa ggaagaggag agggggcccgc agtggcgact cggcgctcgg aagccgggct catggagggg tgaggcggcg
 gtgtgcgag acagtgtcc agccgcgcgc gctccccagg ccttgcccc ggctcgggc cggggaggaa gagtagctcg
 ccgagggccc gaggagagcg ggccgcccc cagcccgagc cggagaggga gcgcgagccg ccgggcccc ggtcgggct
 ccgaaacct gaactttctg ctgtctggg tgcattggag ccttgcttctgctctacc tccacctgc caagtgtcc caggctgac
 ccatggcaga aggaggaggg cagaatcacc acgaatggt gaagtcatg gatgtctacc agcgcagcta ctgcatcca
 atcgagacc tggaggacat cttcaggag taccctgat agatcgagta catctcaag ccatcctgtg tgcccctgat
 gcgatgcggg ggctgctgca atgacgaggg cctggagtgt gtgcccactg aggagtcaa catcacatg cagattatg
 ggatcaaacc tcaccaaggc cagcacatag gagagatgag cttctacag cacaacaat gtgaatgcag accaaagaa
 gatagagcaa gacaagaaaa aaaatcagtt cgaggaaagg gaaaggggca aaaacgaaag cgcaagaaat cccgtcctg
 tggccttgc tcagagcgga gaaagcattt gttgtacaa gatccgcaga cgtgtaaat ttctgcaaa aacacagact
 cgcgttgcaa ggcgagcgag cttgagttaa acgaacgtac ttgcagatgt gacaagccga ggcggtga

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

apma egggqnhhev vkfmdvyqrs ychpietlvd ifqeypdeie yifkpscvpl mrcggccnde glecvptes
 nitmqimrik phqgqhigem sflqhnkcec rpkkdrarqe kksvrgkgkg qkrkrkksry kswsvyvgar cclmpwslpg
 phpcgpcser rkhlfvqdpq tkcscskntd srckarqlel nertcredkpr

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

pvsqpdapg hqrkvsvwid vytratcqr evvplvel mgtvakqlvp scvtvqrcgg ccddglecv
 ptgqhqvrmq ilmiryssq lgemsleehs qcscrpkkkd savkpdraat phhrpqprsv pgwdsapgap spadithptp
 apgsahaap stsaltpgp aaaaadaaas svakgga

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

Ahynteilk sidnewrktq cprevcidv gkefgvatnt ffkppcvsvy rcggccnseg lqcmntstsy
 lsktlfeitv plsqgpkpvt isfanhtser cmskldvyrq vhsiir

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

fa atfydietlk videewqrtq cspretcvev aselgkstnt ffkppcvnvf rcggccnees licmntstsy
 iskqlfeisv pltsvpelvp vkvanhtgck clptarhpy siir

В некоторых примерах любого из антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, антитело и антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с антигеном VEGF (например, 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 антигенсвязывающий фрагмент антитела могут снижать активность VEGF (например, одного 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). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела могут блокировать 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 рецепторами (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 невралгии, вестибулярной шванномы или нейрофиброматоза II типа у млекопитающего по сравнению с уровнем слуха или размером акустической невралгии, 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
 GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS
 TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWIN
 TYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFD
 VWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
 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 переменный 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 переменному домену легкой цепи бевацизумаба и/или содержит переменный 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 переменному 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 переменный домен легкой цепи, который представляет собой или содержит переменный 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)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWIN
TYTGEPTYAADFARRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYF
DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
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

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 250 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 250 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 250 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 250 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 250 аминокислот до около 350 аминокислот, от около 250 аминокислот до около 300 аминокислот, от около 300 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 300 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 300 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 300 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 300 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 300 аминокислот до около 350 аминокислот, от около 350 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 350 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 350 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 350 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 350 аминокислот до около 400 аминокислот, от около 400 аминокислот до около 732 аминокислот, от около 400 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 400 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 400 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 400 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 732 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 500 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 500 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 500 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 550 аминокислот до около 732 аминокислот, от около 550 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 550 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 600 аминокислот до около 732 аминокислот, от около 600 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 600 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 650 аминокислот до около 700 аминокислот или от около 700 аминокислот до около 732 аминокислот) внеклеточной области VEGFR-1 (например, непрерывной последовательности VEGFR-1 человека дикого типа (например, непрерывной последовательности, содержащей один или более (например, один, два, три, четыре, пять, шесть или семь) иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-1 человека дикого типа (например, SEQ ID NO: 23) или последовательность, которая не 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-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)

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCR
 GEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVP
 TSKKKETESAIIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTL
 IPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRP
 VKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTI
 DKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLS
 MKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLIHKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFK
 NLATLIVNVKPKIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTAYGIPQPTIKFWFHPCNHNSHSE
 ARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMAIIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASN
 KVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLKMPTEGEDLKLSCVTNKFLYRDVTWILLRTVNNR
 TMHYSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTYACRARNVYTGEEILQKKEITIRGE
 HCNKKA VFSRISKFKSTRNDCTTQSNVKN

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

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCT
 GCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTAAGATCCTGAACTGAGTTTAA
 AGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGG
 AAGCAGCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGCTG
 AGCATAACTAAATCTGCCTGTGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAACC
 TTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTGTA
 CCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACA

GGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGA
 AGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTT
 AAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAG
 TAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCT
 GTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAACTATCTCACACATCGACAA
 ACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCACGCCAGTCAAATTACTIONAG
 AGGCCATACTCTTGTCTCAATTGTACTGCTACCCTCCCTTGAACACGAGAGTTCA
 AATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAA
 TTGACCAAAGCAATTCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTTCTTACTATTGACAAAA
 TGCAGAACAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTGTAAGGAGTGGACCATCATTC
 AAATCTGTAAACACCTCAGTGCATATATGATAAAGCATTCACTGTGAAACAT
 CGAAAACAGCAGGTGCTTGAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTAT
 GAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTTACCTGC
 GACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTAATTATCAAGGACGT
 AACTGAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGTCTGAGCATAAAACAGTCAAATG
 TGTTTTAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCAGATTTACGAAA
 AGGCCGTGTCATCGTTTCCAGACCCGGCTCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCC
 TGACTIONGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTCTGGCACCCCT
 GTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTTCGAATAATGAAGAGTCTT
 TTATCCTGGATGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGC
 ATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGATGGCTAGCACCTTGGTTGTGGCTGACTC
 TAGAATTTCTGGAATCTACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGACTGTGGGAAG
 AAACATAAGCTTTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGTTTCATGTAACTTGGAAAA
 AATGCCGACGGAAGGAGAGGACCTGAAACTGTCTTGCACAGTTAACAAGTTCTTAT
 ACAGAGACGTTACTTGGATTTTACTGCGGACAGTTAATAACAGAACAATGCACTAC
 AGTATTAGCAAGCAAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCACTCCATCACTCTTAATCTT
 ACCATCATGAATGTTTCCCTGCAAGATTCAGGCACCTATGCCTGCAGAGCCAGGAAT
 GTATACACAGGGGAAGAAATCCTCCAGAAGAAAGAAATTACAATCAGAGGTGAGC
 ACTGCAACAAAAAGGCTGTTTTCTCTCGGATCTCCAAATTTAAAAGCACAAAGGAATG
 ATTGTACCACACAAAGTAATGTAACATTA

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

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCR
 GEAAHKWSLPEMVSKESEKLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNQAQANHTGFYSCKYLAVP
 TSKKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTL
 IPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQNTIIDVQISTPRP
 VKLLRGHTLVLNCTATPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTI
 DKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLS
 MKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFK
 NLATLIVNVKPKIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSE

ARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMAIIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASN
 KVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLEKMPTEGEDLKLSCVTNKFLYRDVTWILLRVTNNR
 TMHYSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTYACRARNVYTGEEILQKKEITIRDQ
 EAPYLLRNLSDHTVAISSSTTLDCHANGVPEPQITWFKNNHKIQQEPELYTSTSPSSSSSSP
 LSSSSSSSSSSSS

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

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCT
 GCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTAAGATCCTGAACTGAGTTTAAA
 AGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGG
 AAGCAGCCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGCTG
 AGCATAACTAAATCTGCCTGTGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAACC
 TTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTGTA
 CCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACA
 GGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGA
 AGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTT
 AAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAG
 TAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCT
 GTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAA
 ACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCACGCCAGTCAAATTACTTAG
 AGGCCATACTCTTGTCTCAATTGTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGTTCA
 AATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAA
 TTGACCAAAGCAATTCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTTCTTACTATTGACAAAA
 TGCAGAACAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTAAAGGAGTGGACCATCATTC
 AAATCTGTAAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCATTTCATCACTGTGAAACAT
 CGAAAACAGCAGGTGCTTGAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTAT
 GAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTTACCTGC
 GACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTAATTATCAAGGACGT
 AACTGAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGTGAGCATAAAACAGTCAAATG
 TGTTTAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCAGATTTACGAAA
 AGGCCGTGTCATCGTTTCCAGACCCGGCTCTCTACCACTGGGCAGCAGACAAATCC
 TGACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTCTGGCACCCCT
 GTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTCCAATAATGAAGAGTCCT
 TTATCCTGGATGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGC
 ATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGATGGCTAGCACCTTGGTTGTGGCTGACTC
 TAGAATTTCTGGAATCTACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGACTGTGGGAAG
 AACATAAGCTTTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGTTTCATGTAACTTGGAAAA
 AATGCCGACGGAAGGAGAGGACCTGAAACTGTCTTGCACAGTTAACAAGTTCTTAT
 ACAGAGACGTTACTTGGATTTTACTGCGGACAGTTAATAACAGAACAATGCACTAC
 AGTATTAGCAAGCAAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCACTCCATCACTCTTAATCTT
 ACCATCATGAATGTTTCCCTGCAAGATTCAGGCACCTATGCCTGCAGAGCCAGGAAT

GTATACACAGGGGAAGAAATCCTCCAGAAGAAAGAAATTACAATCAGAGATCAGG
 AAGCACCATACCTCCTGCGAAACCTCAGTGATCACACAGTGGCCATCAGCAGTTCCA
 CCACTTTAGACTGTCATGCTAATGGTGTCCCCGAGCCTCAGATCACTTGGTTTAAAA
 ACAACCACAAAATACAACAAGAGCCTGAACTGTATACATCAACGTCACCATCGTCA
 TCGTCATCATCACCATTGTCATCATCATCATCATCGTCATCATCATCATCATAG

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

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCR
 GEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVP
 TSKKKETESAIIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTL
 IPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQNTIHDVQISTPRP
 VKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTI
 DKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLS
 MKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFK
 NLATLIVNVKPKIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTAYGIPQPTIKWFVHPCNHNHSE
 ARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMAIIEGKNKLPPANSSFMLPPTSFSNYPHF
 LP

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

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCT
 GCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAATTTAAAAGATCCTGAACTGAGTTTAAA
 AGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGG
 AAGCAGCCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGCTG
 AGCATAACTAAATCTGCCTGTGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAACC
 TTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTGTA
 CCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACA
 GGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGA
 AGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTT
 AAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAG
 TAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCT
 GTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAA
 ACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCACGCCAGTCAAATTAAGTAG
 AGGCCATACTCTTGTCCCTCAATTGTAAGTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGTTCA
 AATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAA
 TTGACCAAAGCAATTCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTTCTTACTATTGACAAAA
 TGCAGAACAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTGTAAGGAGTGGACCATCATTC
 AAATCTGTAAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCATTTCATCACTGTGAAACAT
 CGAAAACAGCAGGTGCTTGAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTAT
 GAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTACCTGC
 GACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTAATTATCAAGGACGT
 AACTGAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGTGCTGAGCATAAAACAGTCAAATG

TGTTTAAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCCAGATTTACGAAA
 AGGCCGTGTCATCGTTTCCAGACCCGGCTCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCC
 TGACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTCTGGCACCCCT
 GTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTTC AATAATGAAGAGTCCT
 TTATCCTGGATGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGC
 ATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGCTTCCACCAGSTAACAGTTCTTTCATGTTG
 CCACSTACAAGCTTCTTCCAACTACTTCCATTTCCCTCCGTGA

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

sklk dpelslkgqtq himqagqtlh lqcrgeaahk wslpemvske serlsitksa cgrngkqfcs tltlntaqan
htgfysckyl avptskkket esaiyifisd tgrpfvemys eipeihmte grelvipcrv tspnitvtlk kfpldtlipd
gkriiwdsrk gfiisnatyk eiglltceat vngglyktny lthrqntii dvqistprpv kllrghtlvtl nctattplnt
rvqmtwsypd eknkrasvrr ridqsnshan ifysvltidk mqnkdkglyt crvrsgpsfk svntsvhiyd
kafitvkhkrk qqvletvagk rsylsmkvk afpspevvwl kdglpateks aryltrgysl iikdvteeda gnytilsik
qsnvfknlta tlvnvpqi yekavssfpd palyplgsrq iltctaygip qptikwfwph cnhnhsearc dfcsnneef
ildadsnmgn riesitqrma iegknkmas tlvvadsris giviciasnk vgtvgrnisf vitdvpngfh vnlekmpteg
edllksetvn kflyrdvtwi llrtvnnrtm hysiskqkma itkehsitln ltimnvsldq sgyacrarn vytgeeilqk
 keitirdqea pyllrnlsdh tvaisssttl dchangvpep qitwfknnhk iqpepgiilg pgsstlfier vteedegvyh
ckatnqkgsv essayltvqg tsdksnle

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

ygsgsklk vpelslkgqtq hvmqagqtlf lkcrgeaahs wslpttvsqe dkrlsitpps acgrdnrqqc stltdtaqa
 nhtglycry lptstskkkk aessiyifvs dagspfiemh tdipklvhmt egrqliipcr vspnvtvtl kkpfdtltp
 dgqritwdsr rgfiianaty keigllncea tvngglyqtn ylthrqnti ldvqirppsp vrllhgqtlv lncatteln
 trvqmswnyp gkatkrasir qridrshshn nvfhsvlkin nvesrdkgly tcrvksqssf qsfntsvhvy ekgfsvkhr
 kqpvqettag rrsylsmkv kafpspeivw lkdgsptlk sarylvhgys liikdvtted agdytillgi kqsrifknl
 atlvnvpqi iyeksvssl pplyplgsr qvltctvygi prptitwlwh pchhnsker ydfctenees fildpssnl
 nriesisqrm tviegtntkv stlvvadsqt pgiyscrafn kigtvernik fyvtdvpngf hvslekmpae gedllkscv
 nkflyrditw illrtvnnrt mhhsiskqkm attqdysitl nviknvsle dsytyacrarn niytedilr ktevlvrdse
 aphllqnl sd yevsisgstt ldcqargvpa pqtwfknnh kiqpepgiil gpgnstlfie rvteedegvy rcratnqkga
 vesaayltvq gtsdksnle

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

ycsgsklk gpelslkgqtq hvmqagqtlf lkcrgeaahs wslpttvsqe dkklsvtrsa cgrnnrqfcs tltlnmaqan
 htglyscryl pkstskekkm esaiyifvsd agspfiemhs dipklvhmte greliipcrv tspnitvtlk kfpfdaltpd
 gqriawdsrr gfiiianaty eiglltceat vngglyqtsy lthrqntil dvqisppspv rllrgqtlvtl nctvtdlnt
 rvqmswnypg katkrasirq ridqsnphsn vfhsvlkinn vesrdkglyt crvksqssfr tfntsvhvy ekgfsvkhrk
 qqvqetiagk rshrlsmkvk afpspevvwl kdgvpateks arysvhgysl iikdvtaeda gdytillgik qsklfrnlta
 tlvnvpqi yeksvsslps pplyplgsrq vltctvygip qptikwfwph chynhskern dfcggseesf ildssnign
 riegitqrm viegtntkvs tlvvadsrtp gsysckafnk igtverdirf yvtdvpngfh vslekipteg edllkscvvs
 kflyrditwi llrtvnnrtm hhsiskqkma ttqdysitln lviknvsled sgyacrarn iytgeeilrk tevlvrdlea plllqnl
 sd evsisgstt dcqargvpa qitwfknnhk iqpepgiilg pgnstlfier vteedegvy cratnqkgsv 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 itcrgqrdld wlpwnnqsgs eqrvevtecs dglfckltli
pkvigndtga ykcfyretld asviyvyvqd yrspfiavsvs dqhgvyvite nknktvvipec lgsisnlvns lcarypekrf
vpdgnriswd skkgftipsy misyagmvfc eakindesyq simyivvvvg yriydvvlsp shgielsvge klvlnctart
elnvgidfnw eypsskhqhk klvnrldktq sgsemkkfls tltidgvtrs dqglytcaas sglmtkknst fvrvehkpfv
afgsgmeslv eatvgervri pakylgyppp eikwykngip lesnhtikag hvltimevse rdtgnytvil tnpiskekqs
 hvvslvvyvp pqigekslis pvdsyqygtt qtlctvyvai ppphhihwyw qleecanep sqavsvtnpy
pceewrsved fgggnkievn knqfaliegk nktvstlvig aanvsalykc eavnkvrge rvisfhvtrg
peitlqpdmq pteqesvslw ctadrstfen ltwyklgppp lpihvgelpt pvcknldtlw klnatmfsns tndilimelk
naslqdgdy vclaqrktk krhecvrqlt vlervaptit gnlenqttsi gesievscta sgnpppqimw fkdnetlved
sgivlkdgnr nltirrvrke deglytcqac svlgcakvea ffiiegaqek tnle

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

asvglpgdfh ppklstqkdi ltilanttlq itcrgqrdld wlpnaqrds eervlvtecg ggdsifcktl tiprvvgndt
 gaykcsyrdv diastvyvyv rdyrspfiavsvs vsdqhgivyv tenknktvvi pcrgsisnlvns vslcarypek rfvpdgnris
 wdseigftlp symisyagmv fceakindet yqsimyivvv vgyriydvil sppheielsa geklvlncta rtelnvgldf
 twhspssksh hkkivnrsvk pfpgtvakmf lltltiesvt ksdqgeytcv assgmikrn rtfvrvhtkp fiafgsgmks
 lveatvgsqv ripvkylsyv apdikwyrng rpienytmv vgdeltimev terdagnytv iltnpismek qshmvslvvn
 vppqigekal ispmvdyqygm tmqtlctvyv anpplhhiqw ywqleeacsy rpgqtspyac kewrhvedfq ggnkievtnk
 qyaliegknk tvstlviaaa nvsalykcea inkagrgerv isfhvirgpe itvqpaaqpt eqesvsllct adrntfenlt
 wyklsqats vhmgesltpv cknldalwkl ngtmfsnstn dilivafqna slqdgdyvc saqdkkktkr helvkqliil
 ermapmitgn lenqtttge tievtcpasg nptphitwfk dnetlvedsg ivlrdgnrnl tirrvrkedg glytcqacnv
 lgcaraetlf iiegaqektn le

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

asvglpgdsh ppklstqkdi ltilanttlq itcrgqrdld wlpntprds eervlvtecg dsifcktlv prvvvgndtga
 ykcfyrdtdv ssivyvyvqd hrspfiavsvs dehgivyvite nknktvvipec rgsisnlvns lcarypekrf vpdgnriswd
 sekgtipsy misyagmvfc eakindetyq simyivlvvg yriydvvlsp pheielsage klvlnctart elnvgldfsw
 qfpsskhqhk kivnrsvksl pgtvakmfls tltidsvtsk dqgeytcay sglmtkknkt fvrvhtkpfv afgsgmkslv
 eatvgsqvri pvkylsyvpadikwyrngrp iesnytmivg deltimevse rdagnytvil tnpismekqs hmvslvvnvp
 pqigekalis pmvdyqygm qtlctvyvan pplhhiqw ywqleeacsy rpgqtspyac kewrhvedfq ggnkievtnk
 aliegknktv stlviaaayv salykceain kagrgervis fhvirgpeit vqpatqpter esmllctad rntfenltwy
 klgsqatsvh mgesltpvck nldalwklng tvfsnstndi livafqnasl qdqgnyvcsa qdkkktkrhc lvkqlviler
 mapmitgnle nqtttgeti evvcptsgnp tplitwfkdn etlvedsgiv lkdgnrnlri rrvrkedggl ytcqacnvlg
 caraetlfii egvqektnle

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

ysmtp tlniteeshv idtgdslls crgqhplewa wpgageapat gkdksedgv vrdcegtar
pvckvlllthe vhandtgsyv cyvyvikari egttaassyv fvrdfeqpfi nkpdttlvr kdamwvpcvl sipglvntlr
sgssvlwpgd qevvwdrrrg mlvstplld alylqettw gdqdfslnpl lvhitgnely diqllprksl ellvgeklvl

**nctvwaefns gvtfdwdypg kqaergkwvp errsqqthte lssiltihnv sqhdlgsyvc kanngiqrfr
estevivhen pfisvewlkg pileatagde lvklpvklaa ypppefqwyk dgkalsgrhs phalvlkevt eastgtytla
lwnsaaglr nislelvvnnv pqqihekeas spsiysrhrs qaltctaygv plplsiqwhw rpwtpckmfa
qrsllrrqqq dmpqcrdwr avttqdavnp iesldtwtef vegknktvsk lviqnanvsa mykcvvsnkv
gqderliyfy vttipdgfti eskpseelle gqpvllscqa dsykyehlrw yrlnlstlhd ahgnpllldc knvhlfatpl
aasleevapg arhatlsli prvapehegh yvcevqdrss hdkhchkkyl svqaleaprl tqnltdllvn vdslemqcl
vagahapsiv wykderllee ksgvdladsn qklsiqrvre edagrylcsv cnakgcvnss asvavegsed kgsmeivlv**

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

ysmtp tlnitedsyv idtgdslsis crgqhplewt wpgaevltt ggkdsedtrv vhdcegtgear pyckvlllaq
thanntgsyh cyukyikari egtaastyv fvrdfkhpfi nkpdtllvnr kdswwvpcv sipglnitr sqssalhpdg
qevlwdrrg mrvptqllrd alylcettw gdqfnlsnf vwhitgnely diqlypkksm ellvgeklvl nctvwaefds
gvtfdwdypg kqaerakwvp errsqqthte lssiltihnv sqndlgpyvc eanngiqrfr estevivhek pfisvewlkg
pvleatagde lvklpvklaa ypppefqwyk drkavtgrhn phalvlkevt easagvytla lwnsaaglrq nislelvvnnv
pphihekeas spsiysrhrs qtlctaygv pqpplsvqwhw rpwtpcktfa qrsllrrqqr dgmpqcrdwr evttqdavnp
iesldswtef vegknktvsk lviqdanvsa mykcvvsnkv gqderliyfy vttipdgfsi esepesdple gqsvrlsca
dnytyehlrw yrlnlstlhd aqgnpllldc knvhlfatpl eanleaepeg arhatlsli prvapedegd yvcevqdrss
qdkhchkkyl svqaleaprl tqnltdllvn vdslemrcp vagahapsiv wykderllek esgidladsn qklsiqrvre
edagrylcsv cnakgcvnss asvavegsed kgsme

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

ysmtp tlnitedsyv idtgdslsis crgqhplewt wrgaevltt ggkdsedtqv vqdcegtgear pyckvlsiaq
thanntgsyy cyukyikari egtaastyv fvrdfeqpfi nkpdtllvnr kdswwvpcv sipglnitr sqssvlhpdg
qevlwdrrg mrvptllrd alylcettw gdqdfnsnf lvhitgnely diqlypkksl ellvgeklvl nctvwaefds
gvtfdwdypg kqaerakwvp errsqqthte lssiltihnv sqhdlgpyvc eanngiqqfr estevivhek pfisvewlkg
pvleatagde mvklpvklaa ypppefqwyk drkavtgrhn phalvlkevt easagvytla lwnsaaglrq nislelvvnnv
pphihekeas spsiysrhrs qtlcttygv pqpplsvqwhw rpwtpcktfa qrsllrrqpr dgmpqcrdwr evttqdavnp
iesldtwtes vegknktvsk lviqdanvsa mykcvvfnkv gqderliyfy vttipdgfsi esepesdple gqsvrlsca
dnytyehlrw yrlnlstlhd aqgnpllldc knvhlfatpl eanleaepeg arhatlsli prvapedegd yvcevqdrss
qdkhchkkyl svqaleaprl tqnltdllvn vrtslmrcp vagahapsiv wykderllek 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 evtcvvdvs hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn

styrvsvlt vlhqdwlngk eykckvsnka lrapiektis kakgqprepq vytlppsde ltknqvsltc lvkgfypsdi
 avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksw qqgnvfscsv mhealthnhyt qkslspspgk

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

vecppcpapp vagpsvflfp pkpkdtlmis rpevtcvvv dvshedpevq fnwyvdgvev hnaktkpree
 qfnstfrvvs vltvvhqdwl ngkeykckvs nkglpapiek tisktkgqpr epqvylpps reemtknqvs ltlvkgfyp
 sdiavewesn gqpennykt ppmlsdgsf flyskltvdk srwqqgnvfv csvmhealthn hytqksls pspgk

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

tcprcpapel lggpsvflfp pkpkdtlmis rpevtcvvv dvshedpevq fkwyvdgvev hnaktkpree
 qfnstfrvvs vltvlhqdw ngkeykckvs nkalpapiek tisktkgqpr epqvylpps reemtknqvs ltlvkgfyp
 sdiavewess gqpennykt ppmlsdgsf flyskltvdk srwqqgnifs csvmhealthn rftqksls pspgk

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)

SDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW
 DSRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK
 LVLNCTARTELVNGIDFNWEYPSKHKHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS
 DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 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 «rAAV» обычно состоят, как минимум, из

транскрипта 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 cis-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

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 высокоразветвленных 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, металлотронеина 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, DQ α и DQ β HLA, рецептора интерлейкина-2, ГКГС класса II, HLA-DR α ГКГС класса II, мышечной креатинкиназы, преальбумина (транстиретина), эластазы I, гена альбумина, c-fos, c-HA-gas, 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 фосфолипидкиназы (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 дексаметазон (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-репрессуемая 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 альфа-миозина (α -MHC) и промотор сердечного тропонина T (cTnT). Дополнительные типичные промоторы

включают бета-актиновый промотор, основной промотор вируса гепатита В (Sandig et al., *Gene Ther.* 3:1002-1009, 1996), промотор альфа-фетопротейна (AFP) (Arbutnot et al., *Hum. Gene Ther.* 7:1503-1514, 1996), промотор остеокальцина костей (Stein et al., *Mol. Biol. Rep.* 24:185-196, 1997); промотор сиалопротейна 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 Т-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 *vfg* (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, антитело, 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 расстоянии 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 W. 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 ААТААА. Последовательность ААТААА может быть замещена другими гексануклеотидными последовательностями, гомологичными ААТААА и способными сигнализировать полиаденилирование, включая АТТААА, АГТААА, САТААА, ТАТААА, ГАТААА, АСТААА, ААТАТА, ААГААА, ААТААТ, АААААА, ААТГАА, ААТСАА, АААСАА, ААТСАА, ААТААС, ААТАГА, ААТТАА или ААТААГ (см., например, WO 06/12414).

В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли (А) может быть синтетическим сайтом полиаденилирования (см., например, вектор экспрессии рС1-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) (АААТААААТАСГАААТГ; 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 используется 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), риновируса 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 люминометре (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 инициирует трансляцию многих генов. Последовательности Козака имеют консенсусную последовательность CCR (A/G) CCAUGG, где R представляет собой пурин (A 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-фетопротеин, 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 улитке, 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 вариабельный домен легкой цепи антитела (например, любой из иллюстративных вариабельных доменов легкой цепи антитела, описанных в данном документе), функционально связанные с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе); (b) 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 (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). 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 (a) 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 (b) 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: (a) полипептид, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела (например, любой из переменных 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 переменный домен легкой цепи антитела (например, любым из переменных 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, любой из иллюстративных антигенсвязывающих фрагментов антитела, описанных в данном документе), связанный с сигнальным пептидом (например, любым из сигнальных пептидов, описанных в данном документе); 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 введение приводит к лечению расстройства внутреннего уха у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления лечение расстройства внутреннего уха приводит к снижению (например, снижение 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 расстройства 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 (a) 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 способ 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 (a) 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 выбирают из группы, состоящей из индуцибельного промотора, конститутивного промотора или тканеспецифичного 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, векторы аденоассоциированного вируса (AAV) могут быть составлены для внутрикочлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, векторы аденоассоциированного вируса (AAV), описанные в данном документе, можно вводить посредством внутрикочлеарного 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 Mirus Bio (Madison, Wis.) и Roche Madison (Madison, Wis.), полимерные составы PhaseRX, такие как, без ограничений, SMARTT POLYMER TECHNOLOGY® (PhaseRX, Seattle, Wash.), DMRI/DOPE, полуксамер, адъювант VAXFECTIN® из Vical (San Diego, Calif.), хитозан, циклодекстрин из Calando Pharmaceuticals (Pasadena, Calif.), дендримеры и полимеры молочно-гликолевой кислоты (PLGA), полимеры RONDEL™ (РНКи/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, deFougerolles, *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 вводиться 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, интراكхлеарное 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 перелимфы. 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 сольubilизации 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 невралгии/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 невралгии/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 внутрикочлеарно 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':

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCTGGG
CGACSTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
AACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT (5' ITR; SEQ ID NO: 36);

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGC
TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC
CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCSTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTTCGAGGTGAGCCC
CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT
TTATTTTTTAATATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCA
GGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGC
GCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGC
GCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTTCGCTGCGTTGCCTT
CGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCG
CGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC
GCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCT
CCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTG
TGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGG
CGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGG
GGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAGGCTGCGTGCGGGGTGT

GTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTTCGGGCTGTAACCCCCC
 CTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGT
 GCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGG
 TGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGG
 CGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTT
 TATGGTAATCGTGCAGAGGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCAAATCTGTGCGGAGC
 CGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGC
 GGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCG
 TCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGG
 GGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCT
 CTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAG (последовательность СВА; SEQ
 ID NO: 37);

CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACC (спейсер; SEQ ID
 NO: 38);

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

GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTC
 TGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACGGCATGAACTGGG
 TCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTTCGGATGGATCAACACCTACACC
 GGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACAC
 CAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCG
 TGTACTACTGCGCCAAGTATCCCCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTTGACG
 TGTGGGGACAGGGCACACTGGTCAAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGC
 GTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGC
 TGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCT
 CTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCT
 CTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
 AATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGA
 GCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGTCTCGGCGGAC
 CTCCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACC
 CTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTC
 AATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGG
 AACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAT
 TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCC
 TATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACA
 CACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTC
 GTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCC
 AGAGAACAACACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCT
 GTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCT
 GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTG

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);

ATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGAC SAACAGC (сигнальная последовательность секретиции IL-2; SEQ ID NO: 43);

GACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACA GAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTGAACTGGTATC AGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCAC TCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACC ATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACC GTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGC TCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTC TGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAG TGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTC CAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTG ACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTAA (последовательность, кодирующая легкую цепь бевацизумаба; SEQ ID NO: 44);

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

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

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

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (3' ITR; 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: 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':

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCTGGG
CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
AACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT (3' ITR; SEQ ID NO: 36);

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGC
TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC
CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCC
CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT
TTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCA
GGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGC
GCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGC
GCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTT
CGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCG
CGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC
GCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCT
CCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTG
TGCCTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGG
CGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGG
GGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGT
GTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCC
CTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGT
GCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGG
TGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGG
CGGCCCCCCGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTT
TATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCAAATCTGTGCGGAGC
CGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGC
GGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCG
TCCCCTTCTCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGG
GGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCT
CTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTCTACAG (последовательность СВА; SEQ
ID NO: 37);

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

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

GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTC
TGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGG

TCCGACAGGCCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTTCGGATGGATCAACACCTACACC
 GGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACAC
 CAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCG
 TGTACTIONTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACG
 TGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGC
 GTTTTCCCCTACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGC
 TGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCT
 CTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTIONT
 CTGAGCAGCGTTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
 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);

ATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGAC
 СААСАGС (сигнальная последовательность секретиции IL-2; SEQ ID NO: 43);

GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTTGTCAACCTGGCGGCTCTC
 TGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGG
 TCCGACAGGCCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTTCGGATGGATCAACACCTACACC
 GGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACAC
 CAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCG
 TGTACTIONTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACG
 TGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGC
 GTTTTCCCCTACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGC
 TGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCT
 CTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTIONT
 CTGAGCAGCGTTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
 AATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGA
 GCTGCGACAAGACCCACACCGGCAAG (последовательность, кодирующая легкую цепь
 ранибизумаба; SEQ ID NO: 53);

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

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

AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCT (линкер; SEQ ID NO: 47);

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
 ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC

AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (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 GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 50). SEQ ID NO: 52 кодирует тяжелую цепь ранибизумаба (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTG EPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG 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':

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCTGGG CGACCTTTGGTCGCCCAGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT (5' ITR; SEQ ID NO: 36);

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT CATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA ACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTTCGAGGTGAGCCC CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT TTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCA GGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGCG GCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCG GCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTTCGCTGCGTTGCCTT CGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCG CGTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC GCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCT CCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTG TGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGG CGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGG GGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGT GTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCC CTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGT GCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGG TGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGG

CGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTTCGAGGCGCGGGAGCCGCAGCCATTGCCTTT
TATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGC
CGAAATCTGGGAGGCGCCGGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGC
GGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCG
TCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGG
GGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGGCGGCTCTAGAGCCT
CTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAG (последовательность СВА; SEQ
ID NO: 37);

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

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

GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTTGTTC AACCTGGCGGCTCTC
TGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGG
TCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTTCGGATGGATCAACACCTACACC
GGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACAC
CAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCG
TGTAATACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCCAGCCACTGGTACTTTGACG
TGTGGGGACAGGGCACACTGGTCCAGTGTCTAGCGCCTTACAAAGGGCCCCAGC
GTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGC
TGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTTGAATTCTGGCGCT
CTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTAТСТ
СТGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AATGTGAACCAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGA
GCTGCGACAAGACCCACACCGGCAAG (последовательность, кодирующая тяжелую
цепь ранибизумаба; SEQ ID NO: 52);

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

GGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAG
AACCCCGGACCT (последовательность Т2А; SEQ ID NO: 42);

ATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTGATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGAC
СААСАГС (сигнальная последовательность секрети IL-2; SEQ ID NO: 43);

GACATCCAGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACA
GAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTGAACTGGTATC
AGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCAC
TCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACC
ATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCC
GTGCCTTGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAATCAAGCGGACTGTGGCCGC
TCTAGCGTGTTTCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTC
TGTCGTGTGCTGTGACAACCTTACCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAG
TGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTC

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

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

ATGGAGAGCGACGAGAGCGGCCTGCCCGCCATGGAGATCGAGTGCCGCATC
ACCGGCACCCTGAACGGCGTGGAGTTCGAGCTGGTGGGCGGCGGAGAGGGCACCCC
CGAGCAGGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGCACCAAAGGCGCCCTGACCTTCA
GCCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACC
CCAGCGGCTACGAGAACCCCTTCCTGCACGCCATCAACAACGGCGGCTACACCAAC
ACCCGCATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCGTGCTGCACGTGAGCTTCAGCTACCG
CTACGAGGCCGGCCGCGTGATCGGCGACTTCAAGGTGATGGGCACCGGCTTCCCCG
AGGACAGCGTGATCTTACCGACAAGATCATCCGCAGCAACGCCACCGTGGAGCAC
CTGCACCCCATGGGCGATAACGATCTGGATGGCAGCTTACCCGCACCTTCAGCCTG
CGCGACGGCGGCTACTACAGCTCCGTGGTGGACAGCCACATGCACTTCAAGAGCGC
CATCCACCCAGCATCCTGCAGAACGGGGGCCCATGTTTCGCCTTCCGCCGCGTGGA
GGAGGATCACAGCAACACCGAGCTGGGCATCGTGGAGTACCAGCACGCCTTCAAGA
CCCCGGATGCAGATGCCGGTGAAGAATAA (последовательность, кодирующая
TurboGFP; SEQ ID NO: 58);

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

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

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

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC
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 GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP
(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

(MESDESGLPAMEIECRITGTLNGVEFELVGGGEGTPEQGRMTNKMSTKGALTFSPYLL
SHVMGYGFYHFGTYPSGYENPFLHAINNGGYTNTRIEKYEDGGVLHVSFSYRYEAGRVI
GDFKVMGTGFPEDSVIFTDKIIRSNATVEHLHPMGDNDLDGSFTRTFSLRDGGYYSSVV

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), который содержит следующие подпоследовательности, идущие в направлении от 5' до 3':

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACSTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTGCGGCCGCACGCGT (5' ITR; SEQ ID NO: 36);

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGCGGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGTCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTTCGGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGCAGCGCCGCCGTTCCCTTCTCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGCGAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTCTACAG (последовательность CBA; SEQ ID NO: 37);

CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACC (спейсер; SEQ ID

NO: 38);

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

AGCGATACCGGCAGACCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCA
TCCACATGACCGAGGGCAGAGAGCTGGTCATCCCCTGCAGAGTGACAAGCCCCAAC
ATCACCGTGACTCTGAAGAAGTTCCTCTGGACACACTGATCCCCGACGGCAAGAG
AATCATCTGGGACAGCCGGAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAAGAGA
TCGGCCTGCTGACCTGTGAAGCCACCGTGAATGGCCACCTGTACAAGACCAACTACC
TGACACACAGACAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCTAGCCACGGC
ATTGAACTGTCTGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGTACCGCCAGAACCGAGCT
GAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCCAGCAGCAAGCACCAAGCACAAGA
AACTGGTCAACCGGGACCTGAAAACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAATTCCTG
AGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCAGATCTGACCAGGGCCTGTACACATGTGC
CGCCAGCTCTGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCACCTTCGTGCGGGTGCACGAGA
AGGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTT
CCGTGTTCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTG
AAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTC AAT
TGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAAC
AGTACAATAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGG
CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTAT
CGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACAC
TGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTC
AAGGGCTTCTACCCTTCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGA
GAACA ACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTA
CAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCA
GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTC
CTGGATAA (последовательность, кодирующая афлиберцепт; SEQ ID NO: 61);

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

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCT
TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT
CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC
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 MYRMQLLSICIALSLALVTNS (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 получения 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 присутствии 2 мкМ этопозида (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 часа после обработки и загружали в 4-12% белковый гель Bolt 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. 1A. 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. 3A и 3B, 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. 1A (фиг. 4A и 4B, соответственно).

Образцы, бевацизумаб в среде из клеток HEK293TF, трансфицированных вектором AAV, показанным на фиг. 1A, 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 1x 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 НЕК293ТF, 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:

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

где первая кодирующая последовательность содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 96% идентичность с SEQ ID NO: 40, и вторая кодирующая последовательность содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 96% идентичности с SEQ ID NO: 44; или

(b) кодирующую последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий один или более растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), функционально связанный с сигнальным пептидом, где кодирующая последовательность содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 96% идентичность с SEQ ID NO: 61;

где первый и второй полипептиды согласно (a) или полипептид согласно b) специфически связываются с одним или более белков VEGF млекопитающих.

2. Вектор AAV по п. 1, в котором нуклеотидная последовательность 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 п. 3, в котором промотор представляет собой промотор CAG, промотор CBA или промотор CMV.

5. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором нуклеотидная последовательность дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования.

6. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором:

(i) первый и второй полипептиды согласно (a) образуют человеческое или гуманизованное антитело против VEGF или фрагмент человеческого или гуманизованного антитела против VEGF, или

(ii) полипептид согласно (b) содержит растворимый рецептор человеческого или гуманизованного VEGF.

7. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором один или более белков VEGF содержат VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D или их комбинацию.

8. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором первый и второй полипептиды согласно (a) или полипептид согласно (b) снижают активность белка VEGF.

9. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором первый и второй полипептиды согласно (а) или полипептид согласно (b) включают одну или более аминокислотных замен, которые уменьшают период полужизни полипептида у млекопитающего по сравнению с контрольным полипептидом, который не включает одну или более аминокислотных замен, которые уменьшают период полужизни контрольного полипептида.

10. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором один из первого и второго полипептидов согласно (а) или полипептид согласно (b) содержат домен Fc.

11. Вектор AAV по п. 10, в котором область Fc содержит одну или более аминокислотных замен, которые уменьшают период полужизни полипептида у млекопитающего по сравнению с контрольным антителом.

12. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором первый и второй полипептиды согласно (а) содержат тяжелую цепь иммуноглобулина, легкую цепь иммуноглобулина или их комбинацию.

13. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором полипептид(ы) согласно (а) содержит(ат):

- (i) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6,
- (ii) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5, или
- (iii) обе (i) и (ii).

14. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором нуклеотид содержит в направлении от 5' до 3' последовательность согласно SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44.

15. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором нуклеотид содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 35.

16. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором нуклеотид содержит одну или более последовательностей, кодирующих пептид вируса *Thosea asigna* 2A (T2A).

17. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области рецептора VEGF-1 (VEGFR-1).

18. Вектор AAV по п. 17, в котором часть внеклеточной области VEGFR-1 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области из VEGFR-1 человека дикого типа.

19. Вектор AAV по любому из пп. 1-12 или 16-17, в котором растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области VEGF рецептора-2 (VEGFR-2).

20. Вектор AAV по п. 19, в котором часть внеклеточной области VEGFR-2 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области из VEGFR-2 человека дикого типа.

21. Вектор AAV по любому из пп. 1-12 или 16-17, в котором растворимый рецептор VEGF содержит два внеклеточных домена рецептора VEGF.
22. Вектор AAV по любому из пп. 1-12 или 21, в котором растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области VEGFR-1 и часть внеклеточной области VEGFR-2.
23. Вектор AAV по п. 22, в котором:
 - часть внеклеточной области VEGFR-1 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области из VEGFR-1 человека дикого типа; и
 - часть внеклеточной области VEGFR-2 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области из VEGFR-2 человека дикого типа.
24. Вектор AAV по любому из пп. 1-12 или 16-23, в котором полипептид согласно (b) содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 12.
25. Вектор AAV по любому из пп. 1-12 или 16-17, в котором растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области рецептора VEGF-3 (VEGFR-3).
26. Вектор AAV по п. 25, в котором часть внеклеточной области VEGFR-3 содержит один или более иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области из VEGFR-3 человека дикого типа.
27. Вектор AAV по любому из пп. 1-12 или 16-26, в котором растворимый рецептор VEGF уменьшает способность VEGF связываться с одним или более из VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3.
28. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором сигнальные пептиды или сигнальный пептид согласно (b) представляют собой сигнальные пептиды IL-2.
29. Вектор AAV по любому из пп. 2-27, дополнительно содержащий два инвертированных концевых повтора (ITR) AAV, где два ITR AAV фланкируют кодирующие последовательности и промотор согласно (a) или кодирующую последовательность и промотор согласно (b).
30. Вектор AAV по п. 29, в котором два ITR AAV представляют собой или получены из ITR AAV2.
31. Вектор AAV по п. 30, 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.
32. Композиция, содержащая вектор AAV по любому из пп. 1-31.
33. Композиция по п. 32, где композиция является фармацевтической композицией, содержащей по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.
34. Выделенная клетка, содержащая вектор AAV по любому из пп. 1-31 или композицию по пп. 32 или 33.
35. Выделенная клетка по п. 34, в которой клетка находится *ex vivo* или *in vitro*.

36. Выделенная клетка по п. 34 или 35, в которой клетка представляет собой клетку млекопитающего, необязательно, где клетка млекопитающего представляет собой клетку человека, необязательно, где клетка человека представляет собой клетку внутреннего уха.

37. Система, содержащая вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность, которая содержит:

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

где первая кодирующая последовательность содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 96% идентичность с SEQ ID NO: 40, и вторая кодирующая последовательность содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 96% идентичности с SEQ ID NO: 44; или

(b) кодирующую последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий один или более растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), функционально связанный с сигнальным пептидом, где кодирующая последовательность содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 96% идентичность с SEQ ID NO: 61;

где первый и второй полипептиды согласно (a) или полипептид согласно b) специфически связываются с одним или более белков VEGF млекопитающих; и

где система содержит:

(i) устройство, способное создавать один или множество разрезов на мембране круглого окна внутреннего уха млекопитающего, и

ii) эффективную дозу вектора AAV.

38. Способ лечения расстройства внутреннего уха у млекопитающего, включающий введение во внутреннее ухо млекопитающего вектора AAV по любому из пп. 1-31 или композиции по п. 32 или п. 33.

39. Способ по п. 40, где млекопитающее представляет собой человека.

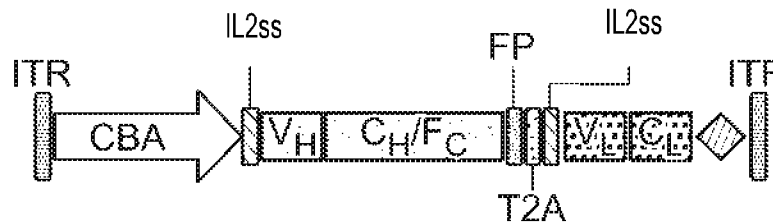
40. Способ по п. 38 или п. 39, где млекопитающее идентифицировано или диагностировано как имеющее вестибулярную шванному.

41. Способ по п. 38 или п. 39, где млекопитающее идентифицировано или диагностировано как имеющее нейрофиброматоз 2-го типа.

42. Набор для повышения уровня антигенсвязывающего фрагмента антитела во внутреннем ухе млекопитающего, где набор содержит вектор AAV по любому из пп. 1-31 или композицию по пп. 32 или 33.

По доверенности

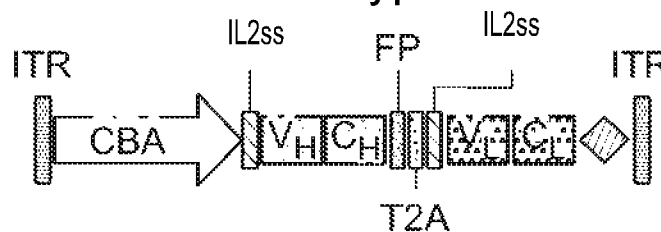
Авастин/бевацизумаб



4474 п.о.

Фигура 1А

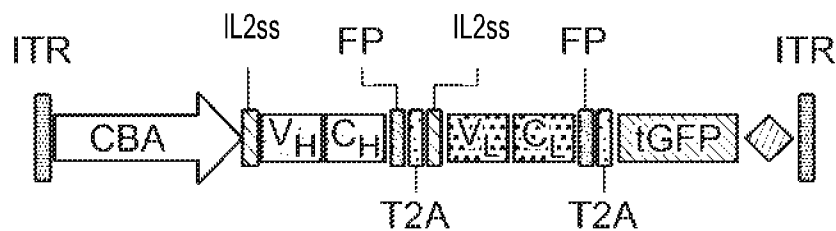
Люцентис/ранибизумаб



3814 п.о.

Фигура 1В

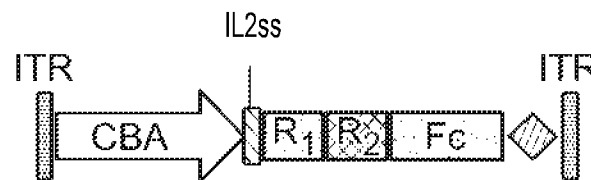
Ранибизумаб.T2A.tGFP



4573 п.о.

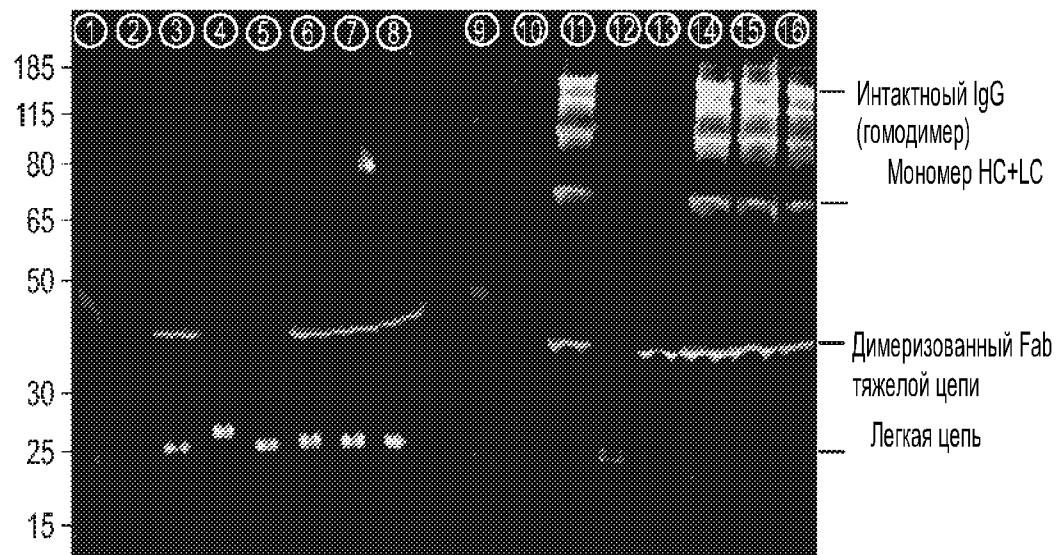
Фигура 1С

Эйлея/афлиберцепт



3631 п.о.

Фигура 1D



1. Предварительно окрашенный набор маркерных белков PageRuler
2. Нетрансфицированный - отрицательный контроль
3. pITR.CBA.бевацизумаб
4. pITR.CBA.люцентис.T2A.tGFP
5. pITR.CBA.люцентис
6. MOI anc80AAP.CBA.бевацизумаб, равная $7,5E4$
7. MOI anc80AAP.CBA.бевацизумаб, равная $2,2E5$
8. MOI anc80AAP.CBA.бевацизумаб, равная $5,5E5$
9. Предварительно окрашенный набор маркерных белков PageRuler

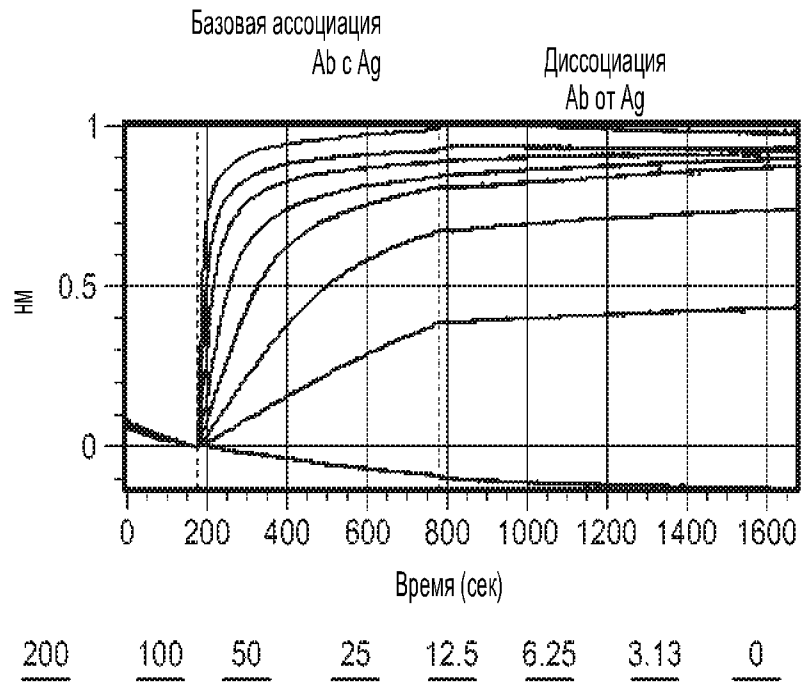
Восстанавливающие условия

10. Нетрансфицированный - отрицательный контроль
11. pITR.CBA.бевацизумаб
12. pITR.CBA.люцентис.T2A.tGFP
13. pITR.CBA.люцентис
14. MOI anc80AAPCBA.бевацизумаб, равная $7,5E4$
15. MOI anc80AAPCBA.бевацизумаб, равная $2,2E5$
16. MOI anc80P.CBA.бевацизумаб, равная $5,5E5$

Невосстанавливающие условия

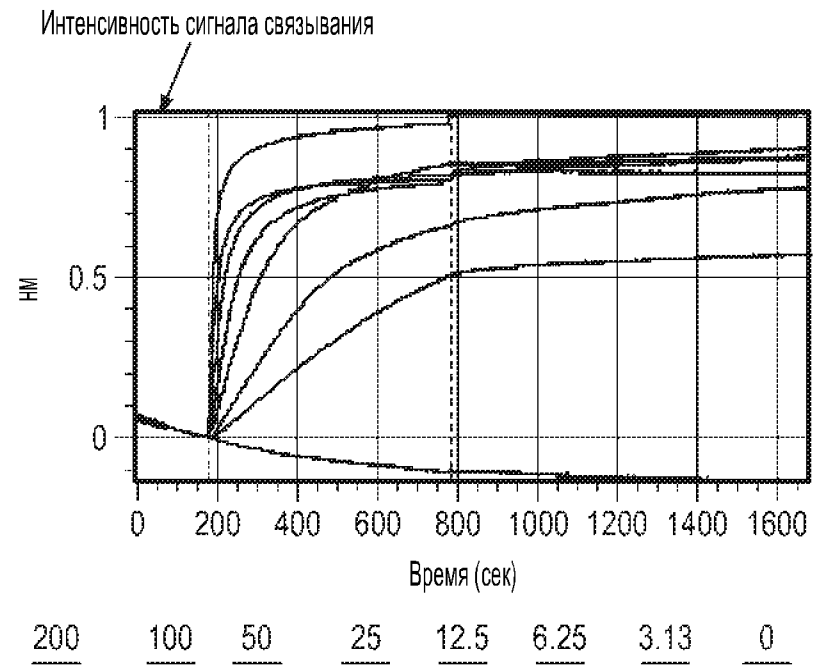
Фигура 2

МmAb против hVEGF (R&D, MAB293-100)



Фигура 3А

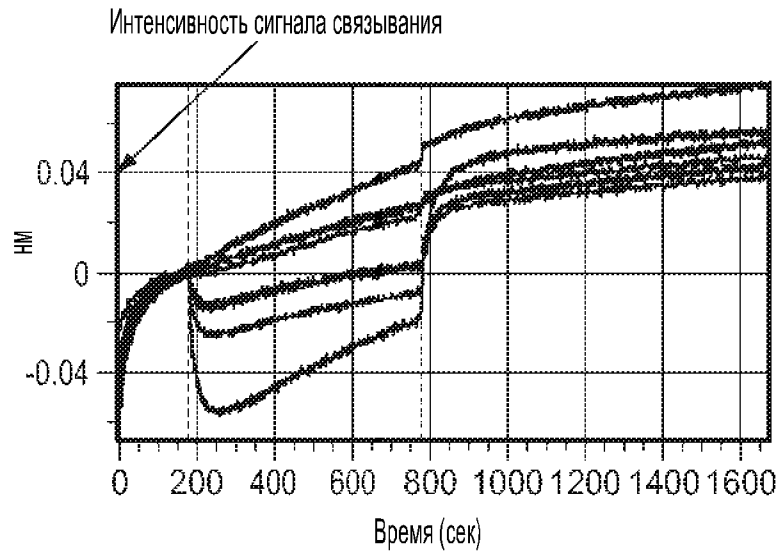
МmAb против hVEGF (R&D, MAB293-100) в СМ*



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

Фигура 3В

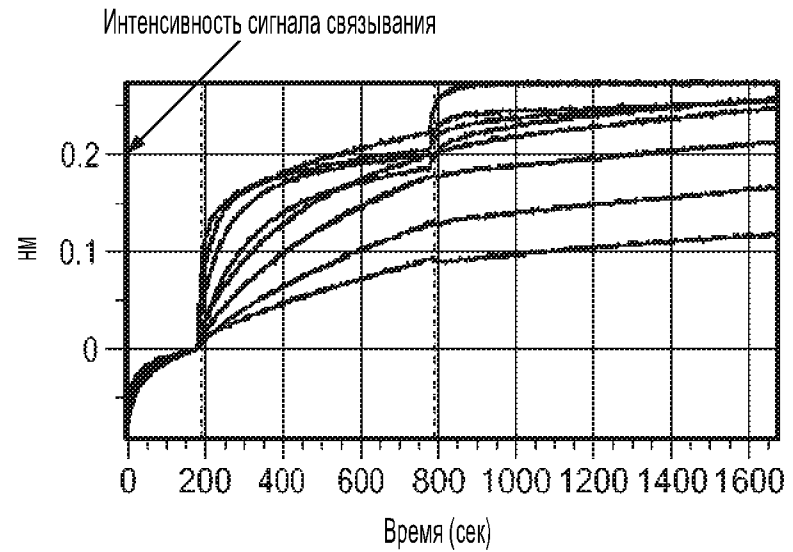
Родительский



200 100 50 25 12.5 6.25 3.13 0
Без аффинности связывания, очень низкая
интенсивность, только фон

Фигура 4А

Бевацизумаб



200 100 50 25 12.5 6.25 3.13 0

Высокая аффинность связывания, но низкая интенсивность

Фигура 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 СМ	<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

Фигура 4С

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202490539А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

C12N15/861, A61K39/395, A61K48/00, A61P27/16, C07K16/22

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	SUZUKI J, HASHIMOTO K, XIAO R, VANDENBERGHE LH, LIBERMAN MC. Cochlear gene therapy with ancestral AAV in adult mice: complete transduction of inner hair cells without cochlear dysfunction. SCI REP. 2017 Apr 3;7:45524. doi: 10.1038/srep45524. Erratum in: Sci Rep. 2017 May 22;7:46827. doi: 10.1038/srep46827. PMID: 28367981; PMCID: PMC5377419. описание Примеры 1-6, Фиг.1-6	1-42
Y	LANDEGGER LD, PAN B, ASKEW C, WASSMER SJ, GLUCK SD, GALVIN A, TAYLOR R, FORGE A, STANKOVIC KM, HOLT JR, VANDENBERGHE LH. A synthetic AAV vector enables safe and efficient gene transfer to the mammalian inner ear. NAT BIOTECHNOL. 2017 Mar;35(3):280-284. doi: 10.1038/nbt.3781. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28165475; PMCID: PMC5340646. описание Фиг.1-3	1-42
Y	WO 2017040528 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 2017-03-09 описание Пример 2, Фиг.4	1-42
Y	WO 2017180936 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 2017-10-19 формула пп.9, 20, описание Фиг.1-8	1-42

 последующие документы указаны в продолжении графы

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

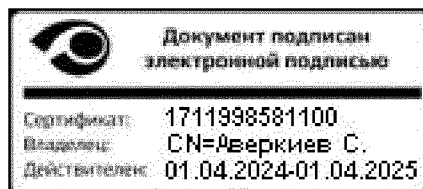
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 09 июля 2024 (09.07.2024)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202490539

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

C12N 15/861 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01)
A61K48/00 (2006.01)
A61P27/16 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

СПК:

A61K39/3955
A61K48/005
A61P27/16
C07K16/22
C07K 2317/14
C07K 2317/24
C07K 2317/76
C12N 2750/14143