



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.12

(51) Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) Номер заявки
201501061

(22) Дата подачи заявки
2014.04.25

(54) АНТИТЕЛА К IGF-1R С ЭЛИМИНИРОВАННОЙ СПОСОБНОСТЬЮ СВЯЗЫВАТЬСЯ С FcRn И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СОСУДИСТЫХ ГЛАЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) **13165741.3; 14151318.4**

(32) **2013.04.29; 2014.01.15**

(33) **EP**

(43) **2016.05.31**

(86) **PCT/EP2014/058418**

(87) **WO 2014/177461 2014.11.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Хартманн Гуидо, Регула Йёрг Томас,
Рют Маттиас, Шефер Вольфганг,
Шлотауер Тильман (DE)**

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

(56) WO-A1-2008077546
WO-A1-2009126304
KIM HYUNCHEOL ET AL.: "FcRn receptor-mediated pharmacokinetics of therapeutic IgG in the eye", MOLECULAR VISION 2009, vol. 15, 2009, pages 2803-2812, XP002688851, ISSN: 1090-0535 the whole document

CHARLOTTE MAGDELAINE-BEUZELIN ET AL.: "Therapeutic antibodies in ophthalmology: Old is new again", MABS, vol. 2, no. 2, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 176-180, XP055079691, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.2.2.11205 the whole document

ROBERT STEINBROOK: "The Price of Sight - Ranibizumab, Bevacizumab, and the Treatment of Macular Degeneration", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 355, no. 14, 5 October 2006 (2006-10-05),

pages 1409-1412, XP055079675, ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMp068185 the whole document

KIM J-K. ET AL.: "Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor, FcRn", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 29, no. 9, 1 September 1999 (1999-09-01), pages 2819-2825, XP002300286, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09<2819:AID-IMMU2819>3.0.CO;2-6 the whole document

TIMOTHY T. KUO ET AL.: "Neonatal Fc Receptor: From Immunity to Therapeutics", JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 30, no. 6, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 777-789, XP019858481, ISSN: 1573-2592, DOI: 10.1007/S10875-010-9468-4 the whole document

TIMOTHY T. KUO ET AL.: "Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics", MABS, 1 September 2011 (2011-09-01), pages 422-430, XP055079703, the whole document

MEDESAN C. ET AL.: "Delineation of the amino acid residues involved in transcytosis and catabolism of mouse IgG1", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 158, no. 5, 1 March 1997 (1997-03-01), pages 2211-2217, XP002532767, ISSN: 0022-1767 the whole document

QIAO S.-W. ET AL.: "Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 105, no. 27, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 9337-9342, XP055046753, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0801717105 the whole document

GHIETIE V. ET AL.: "FcRn: the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter", IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 18, no. 12, 1 December 1997 (1997-12-01), pages 592-598, XP004097421, ISSN: 0167-5699, DOI: 10.1016/S0167-5699(97)01172-9 the whole document

WO-A2-2006031370

(57) Описано антитело к IGF-1R, которое специфически связывается с человеческим IGF-1R, у которого элиминирована способность связываться с FcRn, способ и его применение для лечения сосудистых глазных заболеваний, соответствующая фармацевтическая композиция, а также способ и применение этого антитела для ингибирования ангиогенеза в глазу индивидуума посредством ингибирования передачи сигналов IGF-1R.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к антителам к рецептору человеческого инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) с элиминированной ("молчащей") способностью связываться с FcRn, способам их получения, фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела, и их применениям.

Предпосылки создания изобретения

Рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R, КФ 2.7.10.1, антиген CD 221) принадлежит к семейству трансмембранных протеинтирозинкиназ (LeRoith D. и др., *Endocrin. Rev.* 16, 1995, сс. 143-163; и Adams T.E. и др., *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 2000, сс. 1050-1063). IGF-1R связывается с IGF-1 с высокой аффинностью и инициирует физиологический ответ на указанный лиганд *in vivo*. IGF-1R связывается также с IGF-2, однако с существенно более низкой аффинностью. Сверхэкспрессия IGF-1R усиливает неопластическую трансформацию клеток, и существуют сведения о том, что IGF-1R принимает участие в злокачественной трансформации клеток и поэтому является ценной мишенью для создания терапевтических агентов, предназначенных для лечения рака (Adams T.E. и др., *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 2000, сс. 1050-1063).

Ангиогенез участвует в патогенезе различных нарушений, включая солидные опухоли, внутриглазные неоваскулярные синдромы, такие как пролиферативные ретинопатии или возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), ревматоидный артрит и псориаз (Folkman и др., *J. Biol. Chem.* 267, 1992, сс. 10931-10934; Klagsbrun M. и др., *Annu. Rev. Physiol.* 53, 1991, сс. 217-239 и Garner A., *Vascular diseases, в Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach*, под ред. Garner A. и Klintworth G.K., 2-е изд., изд-во Marcel Dekker, New York, 1994, сс. 1625-1710).

Сосудистые глазные заболевания, такие как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) и диабетическая ретинопатия (DFL), являются результатом аномальной хороидальной или ретиальной неоваскуляризации соответственно. Они являются основными причинами потери зрения у жителей промышленно развитых стран. Поскольку сетчатка состоит из хорошо оформленных слоев нейронных, глиальных и сосудистых элементов, относительно небольшие нарушения, такие, которые имеют место при пролиферации сосудов или отеке, могут приводить к значительному снижению зрительной функции. Наследственные дегенерации сетчатки, такие как пигментный ретинит (RP), ассоциированы также с сосудистыми нарушениями, такими как сужение артериол и сосудистая атрофия. Они поражают 1 из 3500 индивидуумов и характеризуются прогрессирующей ночной слепотой, уменьшением поля зрения, атрофией зрительного нерва, ослаблением артериол и снижением центрального зрения, часто прогрессирующим вплоть до полной слепоты.

Ишемические ретинопатии характеризуются снижением или дисфункцией сосудистой сети сетчатки, что приводит к снижению потока крови и гипоксии. Сетчатка реагирует на гипоксию генерированием сигналов роста новых кровеносных сосудов, однако эти новые сосуды, как правило, являются ломкими и неупорядоченными. Так, рост этих аномальных новых сосудов может создавать угрозу зрению, поскольку они могут истекать, кровоточить или приводить к рубцеванию, что, в конце концов, может заканчиваться отслоением сетчатки. Современные пути лечения ишемических ретинопатий направлены на остановку роста патологических сосудов, но они не воздействуют на лежащую в их основе ишемию, которая запускает их рост. Кроме того, стандартное лечение диабетической ретинопатии, ишемической ретинопатии, которая поражает миллионы людей, включает разрушение части сетчатки лазером с целью прекращения роста новых сосудов и сохранения центрального зрения. Известно применение стратегий для блокады функции сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), основного активатора роста сосудов. Кратковременная анти-VEGF терапия может улучшать зрение, но она не направлена на лежащую в основе заболевания ишемию и фактически может обострять это состояние, поскольку ингибирует рост всех сосудов, включая оказывающие благоприятное действие коллатерали. Существует также серьезная проблема, связанная с системной экспозицией этих лекарственных средств в организме престарелых и/или страдающих диабетом пациентов, для которых может требоваться рост новых сосудов при ишемии головного мозга, сердца или конечностей.

Как правило, при глазных болезнях часто применяют введение в стекловидное тело более мелких фрагментов антител типа Fab или Fab₂, поскольку они имеют короткое время полужизни в сыворотке и более низкий риск системной токсичности. Однако указанные более мелкие фрагменты, как правило, обладают также и более коротким временем полужизни в стекловидном теле (например, из-за более быстрой диффузии в сыворотку) и, как правило, их необходимо чаще дозировать.

У Kim с соавторами (Kim H. и др., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 2008, сс. 2025-2029) описано, что за исключением пигментного эпителия сетчатки и хороидальной ткани, в ткани глаза, включая ресничное тело и радужную оболочку, сетчатку, конъюнктиву, роговицу, хрусталики и пучок зрительного нерва, обнаружено присутствие FcRn-транскрипта предсказанного размера. В гемато-окулярном барьере обнаружена экспрессия FcRn-рецептора, свидетельствующая о том, что этот рецептор может принимать участие в транспорте IgG из тканей глаза в кровеносную систему. Поскольку внутренние ткани глаза, такие как сетчатка, отделены от кровеносной системы гемато-окулярным барьером, нельзя ожидать, что уже через короткое время после интравитреальной инъекции удастся обнаружить полноразмерное антитело в кровеносной системе. Однако все современные фармакокинетические данные, полученные на обе-

зьянах и человеке, свидетельствуют о том, что введенный интравитреально бевацизумаб появляется в крови в течение нескольких часов после интравитреальной инъекции. Таким образом, возможно, что функция FcRn-рецептора в конъюнктивальных лимфатических сосудах состоит в действии в качестве рецептора выведения (эффлюкса) для эффективной элиминации комплексов антиген-антитело в виде IgG из конъюнктивального пространства. Несмотря на сходные молекулярные массы, IgG (150 кДа) обнаружены во внутриглазной жидкости, а IgA (160 кДа) не обнаружены. Различие между проникновением IgG и IgA из сыворотки во внутриглазную жидкость можно объяснить присутствием FcRn-рецепторов, которые являются селективными для IgG.

Кроме того, Kim с соавторами (Kim H. и др., Mol. Vis. 15, 2009, сс. 2803-2.812) описали, что прямая интравитреальная инъекция стала общепринятым подходом введения терапевтических антител в задний сегмент глаза при нарушениях сетчатки. После интравитреального введения как бевацизумаб (IgG), так и куриный IgY преодолевали внутренний ограничивающий мембранный барьер и диффундировали в более глубокие структуры сетчатки. После диффузии через сетчатку бевацизумаб пересекал гемато-ретиальный барьер и просачивался в системный кровоток. Внутри сетчатки куриный IgY был локализован только вдоль наружной (аблюминальной) стороны гемато-ретиального барьера. Кроме того, хороидальные кровеносные сосуды давали отрицательную реакцию в отношении присутствия куриного IgY. Обнаружены физиологически значимые уровни в сыворотке бевацизумаба после интравитреального введения, составляющие вплоть до 30% от инъецируемой дозы. Это позволяет предположить более высокий риск системных побочных действий, чем предполагалось ранее. Гемато-окулярный барьер обладает специфическим механизмом транспортировки и клиренса полноразмерных IgG в системный кровоток. В современных исследованиях подтверждена гипотеза о том, что этот механизм обусловлен неонатальным Fc-рецептором.

Таким образом, в данной области существует необходимость в создании улучшенных средств для лечения и предупреждения различных сосудистых глазных заболеваний, таких как ишемические ретинопатии.

В WO 2008/077546 описаны антитела к рецептору инсулиноподобного фактора роста I и их применение.

В WO 2009/126304 описаны терапевтические комбинации антител к IGF-1R и других соединений.

Magdelaine-Beuzelin C. с соавторами описали применение в офтальмологии старых терапевтических антител, к которым вновь возник интерес (MABS 2, 2010, сс. 176-180).

Steinbrook R. описал цену, которую требуется заплатить за зрение - применение ранибизумаба, бевацизумаба и лечение дегенерации желтого пятна (New Eng. J. Med. 355, 2006, сс. 1409-1412).

Kim J.K. с соавторами описали картирование на человеческом IgG сайта связывания с зависящим от ГКГС класса I рецептором, FcRn (Eur. J. Immunol. 29, 1999, сс. 2819-2825).

Kuo T.T. с соавторами представили обзор данных о неонатальном Fc-рецепторе: от иммунитета до терапевтического применения (J. Clin. Immunol. 30, 2010, сс. 777-789).

Kuo T.T. с соавторами описали неонатальный Fc-рецептор и терапевтические средства на основе IgG (MABS 3, 2011, сс. 422-438).

Medesan C. с соавторами описали разграничение (делимитацию) аминокислотных остатков, участвующих в транцитозе и катаболизме мышинового IgG1 (J. Immunol. 158, 1997, сс. 2211-2217).

Qiao S.-W. с соавторами описали зависимость от опосредуемой антителом презентации антигена на FcRn (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 2008, сс. 9337-9342).

В WO 2006/031370 описаны варианты полипептидов с измененной эффекторной функцией.

Краткое изложение сущности изобретения

Было установлено, что антитела к IGF-1R с элиминированной способностью связываться с FcRn можно применять для лечения связанных с IGF-1R нарушений глаза (сосудистые глазные заболевания).

Одним из объектов изобретения является применение антитела к IGF-1R с элиминированной способностью связываться с человеческим неонатальным Fc-рецептором (FcRn) для ингибирования IGF-1R в глазу.

Одним из объектов изобретения является применение антитела к IGF-1R с элиминированной способностью связываться с человеческим неонатальным Fc-рецептором (FcRn) для лечения сосудистых глазных заболеваний.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R не обладает (остаточной) поддающейся обнаружению способностью связываться с FcRn при определении методом на основе поверхностного плазмонного резонанса.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется величиной K_D , составляющей более 1,7 мкМ при pH 6, т.е. низкой аффинностью.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело имеет такое же или более короткое время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или с их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело имеет время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии, составляющее 3 мин или менее.

В одном из вариантов осуществления изобретения содержащая FcRn аффинная колонка имеет размеры колонки 50 мм × 5 мм, высота слоя составляет 5 см и загрузка составляет 50 мкг антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения уравнивающий буфер содержит 20 mM MES с 150 mM NaCl, значение pH которого доведено до pH 5,5, буфер для элюции содержит 20 mM Трис/HCl с 150 mM NaCl, значение pH которого доведено до pH 8,8, и элюцию осуществляют, используя объем, равный 7,5 объемам колонки (CV), уравнивающего буфера, от 0 до 100% буфера для элюции в объеме, равном 30 CV, а затем 10 CV буфера для элюции.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R не связывается с колонкой с человеческим FcRn из-за одной или нескольких точечных мутаций в CH2- и/или CH3-домене антитела к IGF-1R. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело имеет сопоставимое, т.е. находящееся в пределах $\pm 10\%$, или укороченное время удерживания на содержащей FcRn колонке по сравнению с антителом к IGF-1R с 4 точечными мутациями (HCl: I253A, H310A, H435A; HC2: H310A).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область по меньшей мере с одной из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 03, или антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 04.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) или их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере мутации I253A/H310A/H435A или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет, по меньшей мере, мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в обоих полипептидах Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 02, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03 или SEQ ID NO: 04.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03.

Они представляют собой последовательности антитела AK18 (<IGF-1R> HUMAB, клон 18), которое описано подробно в WO 2005/005635.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит вариабельный домен модифицированной тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) и соответствующие HVR, происходящие из антитела AK18 (<IGF-1R> HUMAB, клон 18), с улучшенной аффинностью, что описано подробно в WO 2013/041462. Указанные обладающие улучшенной аффинностью антитела к IGF-1R в сочетании с мутациями в Fc-области, представленными в настоящем описании, являются особенно ценными для лечения соответствующих сосудистых глазных заболеваний и воспалительных заболеваний.

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (HVR-L3), или

б) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (HVR-L3), или

в) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77 (HVR-L3), или

г) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 (HVR-L3), или

д) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93 (HVR-L3).

Таким образом, в другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит

а) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 62, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 63, или

б) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 70, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 71, или

в) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 78, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 79, или

г) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 86, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 87, или

д) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 94, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 95.

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (HVR-L3).

Таким образом, в другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последова-

тельность SEQ ID NO: 80 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 (HVR-L3).

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит

а) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 62, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 63.

Таким образом, в другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит

г) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 86, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 87.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет гетеродимерную Fc-область.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой выделенное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 05 или SEQ ID NO: 06.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VL-последовательность SEQ ID NO: 07 или SEQ ID NO: 08.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 05 и VL-последовательность SEQ ID NO: 07.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 06 и VL-последовательность SEQ ID NO: 08.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области, в котором

I) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутацию Y436A, или

II) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации I253A, H310A и H435A, или

III) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации H310A, H433A и Y436A, или

IV) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации L251D, L314D и L432D, или

V) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации L251S, L314S и L432S, или

VI) первый полипептид Fc-области содержит мутацию Y436A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации I253A, H310A и H435A, или

б) мутации H310A, H433A и Y436A, или

в) мутации L251D, L314D и L432D, или

г) мутации L251S, L314S и L432S, или

VII) первый полипептид Fc-области содержит мутации I253A, H310A и H435A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации H310A, H433A и Y436A, или

б) мутации L251D, L314D и L432D, или

в) мутации L251S, L314S и L432S, или

VIII) первый полипептид Fc-области содержит мутации H310A, H433A и Y436A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации L251D, L314D и L432D, или

б) мутации L251S, L314S и L432S, или

IX) первый полипептид Fc-области содержит мутации L251D, L314D и L432D, а второй полипептид Fc-области содержит мутации L251S, L314S и L432S.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с человеческим FcRn. В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с белком А стафилококков.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с человеческим FcRn. В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело может связываться специфически с белком А стафилококков.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область,

содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат одну или две мутации, выбранные из I) группы I253A, H310A и H435A, или II) группы H310A, H433A и Y436A, или III) группы L251D, L314D и L432D (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области, и одну или две мутации, выбранные из группы, содержащей мутации L251D, I253A, H310A, L314D, L432D, H433A, H435A и Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации I) I253A, H310A и H435A или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в варианте Fc-области (человеческого) IgG-класса.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации в Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), где I) все мутации находятся в первом или втором полипептиде Fc-области или II) одна или две мутации находятся в первом полипептиде Fc-области и одна или две мутации находятся во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации I) I253A, H310A и H435A или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в Fc-области.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D в первом, а также во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), или которые содержат мутации I253A/H310A/H435A в первом полипептиде Fc-области и мутации H310A/H433A/Y436A во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения второй полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V (приводящие к образованию "впадины"), а первый полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации S354C и T366W (приводящие к образованию "выступа").

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения полипептиды Fc-области относятся к человеческому IgG1-подклассу. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутации L234A и L235A. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутацию P329G.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения полипептиды Fc-области относятся к человеческому IgG4-подклассу. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутации S228P и L235E. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутацию P329G.

Одним из объектов настоящего изобретения является способ лечения пациента, страдающего сосудистыми глазными заболеваниями, заключающийся в том, что вводят антитело к IGF-1R, указанное в настоящем описании, пациенту, который нуждается в таком лечении.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R не обладает (остаточной) поддающейся обнаружению способностью связываться с FcRn при определении методом на основе поверхностного плазмонного резонанса.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R связывание антитела с человеческим FcRn характеризуется величиной K_D , составляющей более 1,7 мкМ при pH 6, т.е. низкой аффинностью.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело имеет такое же или укороченное время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или с их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело имеет время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии, составляющее 3 мин или менее.

В одном из вариантов осуществления изобретения содержащая FcRn аффинная колонка имеет размеры колонки 50 мм × 5 мм, высота слоя составляет 5 см и загрузка составляет 50 мкг антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения уравнивающий буфер содержит 20 mM MES с 150 mM NaCl, значение pH которого доведено до pH 5,5, буфер для элюции содержит 20 mM Трис/НСl с 150 mM NaCl, значение pH которого доведено до pH 8,8, и элюцию осуществляют, используя объем, равный 7,5 объемам колонки (CV), уравнивающего буфера, от 0 до 100% буфера для элюции в объеме, равном

30 CV, а затем 10 CV буфера для элюции.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R не связывается с колонкой с человеческим FcRn из-за одной или нескольких точечных мутаций в CH2- и/или CH3-домене антитела к IGF-1R. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело имеет сопоставимое, т.е. находящееся в пределах $\pm 10\%$, или укороченное время удерживания на содержащей FcRn колонке по сравнению с антителом к IGF-1R с 4 точечными мутациями (HC1: I253A, H310A, H435A; HC2: H310A).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область по меньшей мере с одной из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254FL, H310A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 03, или антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 04.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) или их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет, по меньшей мере, мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в обоих полипептидах Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 02, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03 или SEQ ID NO: 04.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03.

Они представляют собой последовательности антитела AK18 (<IGF-1R> HUMAB, клон 18), которое описано подробно в WO 2005/005635.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит переменный домен модифицированной тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) и соответствующие HVR, происходящие из антитела AK18 (<IGF-1R> HUMAB, клон 18), с улучшенной аффинностью, что описано подробно в WO 2013/041462. Указанные обладающие улучшенной аффинностью антитела к IGF-1R в сочетании с мутациями в Fc-области, представленные в настоящем описании, являются особенно ценными для лечения соответствующих сосудистых глазных заболеваний и воспали-

цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 63.

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит

г) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 86, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 87.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело к IGF-1R имеет гетеродимерную Fc-область.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело представляет собой выделенное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 05 или SEQ ID NO: 06.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VL-последовательность SEQ ID NO: 07 или SEQ ID NO: 08.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 05 и VL-последовательность SEQ ID NO: 07.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 06 и VL-последовательность SEQ ID NO: 08.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области, в котором

I) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутацию Y436A, или

II) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации I253A, H310A и H435A, или

III) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации H310A, H433A и Y436A, или

IV) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации L251D, L314D и L432D, или

V) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации L251S, L314S и L432S, или

VI) первый полипептид Fc-области содержит мутацию Y436A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации I253A, H310A и H435A, или

б) мутации H310A, H433A и Y436A, или

в) мутации L251D, L314D и L432D, или

г) мутации L251S, L314S и L432S, или

VII) первый полипептид Fc-области содержит мутации I253A, H310A и H435A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации H310A, H433A и Y436A, или

б) мутации L251D, L314D и L432D, или

в) мутации L251S, L314S и L432S, или

VIII) первый полипептид Fc-области содержит мутации H310A, H433A и Y436A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации L251D, L314D и L432D, или

б) мутации L251S, L314S и L432S, или

IX) первый полипептид Fc-области содержит мутации L251D, L314D и L432D, а второй полипептид Fc-области содержит мутации L251S, L314S и L432S.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с человеческим FcRn. В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с белком А стафилококков.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с человеческим FcRn. В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело может связываться: специфически с белком А стафилококков.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат одну или две мутации, выбранные из I) группы I253A, H310A и H435A, или II) группы H310A, H433A и Y436A, или III) группы L251D, L314D и L432D (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области, и одну или две мутации, выбранные из группы, содержащей мутации L251D, I253A, H310A, L314D, L432D, H433A, H435A и Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и

L432D содержатся в варианте Fc-области (человеческого) IgG-класса.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации в Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), где I) все мутации находятся в первом или втором полипептиде Fc-области или II) одна или две мутации находятся в первом полипептиде Fc-области и одна или две мутации находятся во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в Fc-области.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D в первом, а также во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), или которые содержат мутации I253A/H310A/H435A в первом полипептиде Fc-области и мутации H310A/H433A/Y436A во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения второй полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V (приводящие к образованию "впадины"), а первый полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации S354C и T366W (приводящие к образованию "выступа").

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения полипептиды Fc-области относятся к человеческому IgG1-подклассу. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутации L234A и L235A. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутацию P329G.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения полипептиды Fc-области относятся к человеческому IgG4-подклассу. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутации S228P и L235E. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутацию P329G.

Одним из объектов изобретения является антитело к IGF-1R с элиминированной способностью связываться с человеческим неонатальным Fc-рецептором (FcRn), предназначенное для интравитреального введения.

Согласно одному из объектов изобретения антитело к IGF-1R с элиминированной способностью связываться с человеческим неонатальным Fc-рецептором (FcRn), предназначено для лечения сосудистых глазных заболеваний.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R не обладает (остаточной) поддающейся обнаружению способностью связываться с FcRn при определении методом на основе поверхностного плазмонного резонанса.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется величиной K_D , составляющей более 1,7 мкМ при pH 6, т.е. низкой аффинностью.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело имеет такое же или укороченное время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или с их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело имеет время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии, составляющее 3 мин или менее.

В одном из вариантов осуществления изобретения содержащая FcRn аффинная колонка имеет размеры колонки 50 мм × 5 мм, высота слоя составляет 5 см и загрузка составляет 50 мкг антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения уравнивающий буфер содержит 20 mM MES с 150 mM NaCl, значение pH которого доведено до pH 5,5, буфер для элюции содержит 20 mM Трис/НСl с 150 mM NaCl, значение pH которого доведено до pH 8,8, и элюцию осуществляют, используя объем, равный 7,5 объемам колонки (CV), уравнивающего буфера, от 0 до 100% буфера для элюции в объеме, равном 30 CV, а затем 10 CV буфера для элюции.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R не связывается с колонкой с человеческим FcRn из-за одной или нескольких точечных мутаций в CH2- и/или CH3-домене антитела к IGF-1R. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело имеет сопоставимое, т.е. находя-

щееся в пределах $\pm 10\%$, или укороченное время удерживания на содержащей FcRn колонке по сравнению с антителом к IGF-1R с 4 точечными мутациями (HC1: I253A, H310A, H435A; HC2: H310A).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область по меньшей мере с одной из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 03, или антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 04.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) или их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254FL, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в обоих полипептидах Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 02, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03 или SEQ ID NO: 04.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1) аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03.

Они представляют собой последовательности антитела AK18 (<IGF-1R> HUMAB, клон 18), которое описано подробно в WO 2005/005635.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит вариабельный домен модифицированной тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) и соответствующие HVR, происходящие из антитела AK18 (<IGF-1R> HUMAB, клон 18), с улучшенной аффинностью, что описано подробно в WO 2013/041462. Указанные обладающие улучшенной аффинностью антитела к IGF-1R в сочетании с мутациями в Fc-области, представленные в настоящем описании, являются особенно ценными для лечения соответствующих сосудистых глазных заболеваний и воспалительных заболеваний.

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (HVR-H2) и ами-

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело к IGF-1R имеет гетеродимерную Fc-область.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело представляет собой выделенное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 05 или SEQ ID NO: 06.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VL-последовательность SEQ ID NO: 07 или SEQ ID NO: 08.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 05 и VL-последовательность SEQ ID NO: 07.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 06 и VL-последовательность SEQ ID NO: 08.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области, в котором

I) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутацию Y436A, или

II) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации I253A, H310A и H435A, или

III) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации H310A, H433A и Y436A, или

IV) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации L251D, L314D и L432D, или

V) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации L251S, L314S и L432S, или

VI) первый полипептид Fc-области содержит мутацию Y436A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации I253A, H310A и H435A, или

б) мутации H310A, H433A и Y436A, или

в) мутации L251D, L314D и L432D, или

г) мутации L251S, L314S и L432S, или

VII) первый полипептид Fc-области содержит мутации I253A, H310A и H435A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации H310A, H433A и Y436A, или

б) мутации L251D, L314D и L432D, или

в) мутации L251S, L314S и L432S, или

VIII) первый полипептид Fc-области содержит мутации H310A, H433A и Y436A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации L251D, L314D и L432D, или

б) мутации L251S, L314S и L432S, или

IX) первый полипептид Fc-области содержит мутации L251D, L314D и L432D, а второй полипептид Fc-области содержит мутации L251S, L314S и L432S.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с человеческим FcRn. В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с белком А стафилококков.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с человеческим FcRn. В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело может связываться специфически с белком А стафилококков.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат одну или две мутации, выбранные из I) группы I253A, H310A и H435A, или II) группы H310A, H433A и Y436A, или III) группы L251D, L314D и L432D (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области, и одну или две мутации, выбранные из группы, содержащей мутации L251D, I253A, H310A, L314D, L432D, H433A, H435A и Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в варианте Fc-области (человеческого) IgG-класса.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их

комбинации в Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), где I) все мутации находятся в первом или втором полипептиде Fc-области, или II) одна или две мутации находятся в первом полипептиде Fc-области и одна или две мутации находятся во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в Fc-области.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D в первом, а также во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), или которые содержат мутации I253A/H310A/H435A в первом полипептиде Fc-области и мутации H310A/H433A/Y436A во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения второй полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V (приводящие к образованию "впадины"), а первый полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации S354C и T366W (приводящие к образованию "выступа").

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения полипептиды Fc-области относятся к человеческому IgG1-подклассу. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутации L234A и L235A. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутацию P329G.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения полипептиды Fc-области относятся к человеческому IgG4-подклассу. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутации S228P и L235E. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутацию P329G.

Одним из объектов изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая антитело к IGF-1R с элиминированной способностью связываться с человеческим неонатальным Fc-рецептором (FcRn) и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R не обладает (остаточной) поддающейся обнаружению способностью связываться с FcRn при определении методом на основе поверхностного плазмонного резонанса.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R связывание антитела с человеческим FcRn характеризуется величиной K_D , составляющей более 1,7 мкМ при pH 6, т.е. низкой аффинностью.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело имеет такое же или укороченное время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или с их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело имеет время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии, составляющее 3 мин или менее.

В одном из вариантов осуществления изобретения содержащая FcRn аффинная колонка имеет размеры колонки 50 мм × 5 мм, высота слоя составляет 5 см и загрузка составляет 50 мкг антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения уравнивающий буфер содержит 20 мМ MES с 150 мМ NaCl, значение pH которого доведено до pH 5,5, буфер для элюции содержит 20 мМ Трис/HCl с 150 мМ NaCl, значение pH которого доведено до pH 8,8, и элюцию осуществляют, используя объем, равный 7,5 объемам колонки (CV), уравнивающего буфера, от 0 до 100% буфера для элюции в объеме, равном 30 CV, а затем 10 CV буфера для элюции.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R не связывается с колонкой с человеческим FcRn из-за одной или нескольких точечных мутаций в CH2- и/или CH3-домене антитела к IGF-1R. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело имеет сопоставимое, т.е. находящееся в пределах $\pm 10\%$, или укороченное время удерживания на содержащей FcRn колонке по сравнению с антителом к IGF-1R с 4 точечными мутациями (HC1: I253A, H310A, H435A; HC2: H310A).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область по меньшей мере с одной из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, кото-

рое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 03, или антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 04.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) или их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере мутации I253A/H310A/H435A или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в обоих полипептидах Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 02, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03 или SEQ ID NO: 04.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01, и б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03.

Они представляют собой последовательности антитела AK18 (<IGF-1R> HUMAB, клон 18), которое описано подробно в WO 2005/005635.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит вариабельный домен модифицированной тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) и соответствующие HVR, происходящие из антитела AK18 (<IGF-1R> HUMAB, клон 18), с улучшенной аффинностью, что описано подробно в WO 2013/041462. Указанные обладающие улучшенной аффинностью антитела к IGF-1R в сочетании с мутациями в Fc-области, представленные в настоящем описании, являются особенно ценными для лечения соответствующих сосудистых глазных заболеваний и воспалительных заболеваний.

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (HVR-L3), или

б) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69

манизированное или химерное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 05 или SEQ ID NO: 06.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VL-последовательность SEQ ID NO: 07 или SEQ ID NO: 08.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 05 и VL-последовательность SEQ ID NO: 07.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 06 и VL-последовательность SEQ ID NO: 08.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области, в котором

I) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутацию Y436A, или

II) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации I253A, H310A и H435A, или

III) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации H310A, H433A и Y436A, или

IV) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации L251D, L314D и L432D, или

V) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации L251S, L314S и L432S, или

VI) первый полипептид Fc-области содержит мутацию Y436A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации I253A, H310A и H435A, или

б) мутации H310A, H433A и Y436A, или

в) мутации L251D, L314D и L432D, или

г) мутации L251S, L314S и L432S, или

VII) первый полипептид Fc-области содержит мутации I253A, H310A и H435A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации H310A, H433A и Y436A, или

б) мутации L251D, L314D и L432D, или

в) мутации L251S, L314S и L432S, или

VIII) первый полипептид Fc-области содержит мутации H310A, H433A и Y436A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации L251D, L314D и L432D, или

б) мутации L251S, L314S и L432S, или

IX) первый полипептид Fc-области содержит мутации L251D, L314D и L432D, а второй полипептид Fc-области содержит мутации L251S, L314S и L432S.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с человеческим FcRn. В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с белком А стафилококков.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с человеческим FcRn. В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело может связываться специфически с белком А стафилококков.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат одну или две мутации, выбранные из I) группы I253A, H310A и H435A, или II) группы H310A, H433A и Y436A, или III) группы L251D, L314D и L432D (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области, и одну или две мутации, выбранные из группы, содержащей мутации L251D, I253A, H310A, L314D, L432D, H433A, H435A и Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в варианте Fc-области (человеческого) IgG-класса.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации в Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), где I) все мутации находятся в первом или втором полипептиде Fc-области, или II) одна или две мутации находятся в первом полипептиде Fc-области и одна или две мутации находятся во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в Fc-области.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D в первом, а

также во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), или которые содержат мутации I253A/H310A/H435A в первом полипептиде Fc-области и мутации H310A/H433A/Y436A во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения второй полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V (приводящие к образованию "впадины"), а первый полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации S354C и T366W (приводящие к образованию "выступа").

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения полипептиды Fc-области относятся к человеческому IgG1-подклассу. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутации L234A и L235A. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутацию P329G.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения полипептиды Fc-области относятся к человеческому IgG4-подклассу. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутации S228P и L235E. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутацию P329G.

Одним из объектов изобретения является антитело к IGF-1R с элиминированной способностью связываться с человеческим неонатальным Fc-рецептором (FcRn).

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R не обладает (остаточной) поддающейся обнаружению способностью связываться с FcRn при определении методом на основе поверхностного плазмонного резонанса.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется величиной K_D , составляющей более 1,7 мкМ при pH 6, т.е. низкой аффинностью.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело имеет такое же или укороченное время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или с их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело имеет время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии, составляющее 3 мин или менее.

В одном из вариантов осуществления изобретения содержащая FcRn аффинная колонка имеет размеры колонки 50 мм × 5 мм, высота слоя составляет 5 см и загрузка составляет 50 мкг антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения уравнивающий буфер содержит 20 mM MES с 150 mM NaCl, значение pH которого доведено до pH 5,5, буфер для элюции содержит 20 mM Трис/HCl с 150 mM NaCl, значение pH которого доведено до pH 8,8, и элюцию осуществляют, используя объем, равный 7,5 объемам колонки (CV), уравнивающего буфера, от 0 до 100% буфера для элюции в объеме, равном 30 CV, а затем 10 CV буфера для элюции.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R не связывается с колонкой с человеческим FcRn из-за одной или нескольких точечных мутаций в CH2- и/или CH3-домене антитела к IGF-1R. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело имеет сопоставимое, т.е. находящееся в пределах $\pm 10\%$, или укороченное время удерживания на содержащей FcRn колонке по сравнению с антителом к IGF-1R с 4 точечными мутациями (HC1: I253A, H310A, H435A; HC2: H310A).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область по меньшей мере с одной из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 03, или антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 04.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну

из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) или их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет, по меньшей мере, мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в обоих полипептидах Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 02, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03 или SEQ ID NO: 04.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03.

Они представляют собой последовательности антитела AK18 (<IGF-1R> HUMAB, клон 18), которое описано подробно в WO 2005/005635.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит вариабельный домен модифицированной тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) и соответствующие HVR, происходящие из антитела AK18 (<IGF-1R> HUMAB, клон 18), с улучшенной аффинностью, что описано подробно в WO 2013/041462. Указанные обладающие улучшенной аффинностью антитела к IGF-1R в сочетании с мутациями в Fc-области, представленные в настоящем описании, являются особенно ценными для лечения соответствующих сосудистых глазных заболеваний и воспалительных заболеваний.

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет

а) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (HVR-L3), или

б) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (HVR-L3), или

в) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77 (HVR-L3), или

г) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 (HVR-H2) и ами-

ноктислотную последовательность SEQ ID NO: 82 (HVR-H3), и легкую цепь антителя, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 (HVR-L3), или

д) тяжелую цепь антителя, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90 (HVR-H3), и легкую цепь антителя, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93 (HVR-L3).

Таким образом, в другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антители к IGF-1R содержат

а) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 62, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 63, или

б) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 70, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 71, или

в) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 78, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 79, или

г) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 86, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 87, или

д) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 94, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 95.

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антители к IGF-1R имеют тяжелую цепь антителя, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (HVR-H3), и легкую цепь антителя, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (HVR-L3).

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антители к IGF-1R имеют тяжелую цепь антителя, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 (HVR-H3), и легкую цепь антителя, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 (HVR-L3).

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антители к IGF-1R содержат

а) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 62, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 63.

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антители к IGF-1R содержат

г) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 86, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 87.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антители к IGF-1R имеют гетеродимерную Fc-область.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антители представляют собой выделенные антители.

В одном из вариантов осуществления изобретения антители представляют собой полноразмерные антители.

В одном из вариантов осуществления изобретения антители представляют собой моноклональные антители.

В одном из вариантов осуществления изобретения антители представляют собой человеческое, гуманизированное или химерное антители.

В одном из вариантов осуществления изобретения антители содержат VH-последовательность SEQ ID NO: 05 или SEQ ID NO: 06.

В одном из вариантов осуществления изобретения антители содержат VL-последовательность SEQ ID NO: 07 или SEQ ID NO: 08.

В одном из вариантов осуществления изобретения антители содержат VH-последовательность SEQ ID NO: 05 и VL-последовательность SEQ ID NO: 07.

В одном из вариантов осуществления изобретения антители содержат VH-последовательность SEQ ID NO: 06 и VL-последовательность SEQ ID NO: 08.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области, в котором

- I) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутацию Y436A, или
- II) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации I253A, H310A и H435A, или
- III) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации H310A, H433A и Y436A, или
- IV) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации L251D, L314D и L432D, или
- V) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации L251S, L314S и L432S, или
- VI) первый полипептид Fc-области содержит мутацию Y436A, а второй полипептид Fc-области содержит

- а) мутации I253A, H310A и H435A, или
- б) мутации H310A, H433A и Y436A, или
- в) мутации L251D, L314D и L432D, или
- г) мутации L251S, L314S и L432S, или

VII) первый полипептид Fc-области содержит мутации I253A, H310A и H435A, а второй полипептид Fc-области содержит

- а) мутации H310A, H433A и Y436A, или
- б) мутации L251D, L314D и L432D, или
- в) мутации L251S, L314S и L432S, или

VIII) первый полипептид Fc-области содержит мутации H310A, H433A и Y436A, а второй полипептид Fc-области содержит

- а) мутации L251D, L314D и L432D, или
- б) мутации L251S, L314S и L432S, или

IX) первый полипептид Fc-области содержит мутации L251D, L314D и L432D, а второй полипептид Fc-области содержит мутации L251S, L314S и L432S.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не связывается специфически с человеческим FcRn. В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не связывается специфически с белком А стафилококков.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не связывается специфически с человеческим FcRn. В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело связывается специфически с белком А стафилококков.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат одну или две мутации, выбранные из I) группы I253A, H310A и H435A, или II) группы H310A, H433A и Y436A, или III) группы L251D, L314D и L432D (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области, и одну или две мутации, выбранные из группы, содержащей мутации L251D, I253A, H310A, L314D, L432D, H433A, H435A и Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в варианте Fc-области (человеческого) IgG-класса.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации в Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), где I) все мутации находятся в первом или втором полипептиде Fc-области, или II) одна или две мутации находятся в первом полипептиде Fc-области и одна или две мутации находятся во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в Fc-области.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D в первом, а также во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), или которые содержат мутации I253A/H310A/H435A в первом полипептиде Fc-области и мутации H310A/H433A/Y436A во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения второй полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V (приводящие к образованию "впадины"), а первый полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации S354C и T366W (приводящие к образованию "выступа").

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения полипептиды Fc-области относят-

ся к человеческому IgG1-подклассу. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутации L234A и L233A. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутацию P329G.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения полипептиды Fc-области относятся к человеческому IgG4-подклассу. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутации S228P и L235E. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутацию P329G.

Одним из объектов изобретения является нуклеиновая кислота, которая кодирует антитело к IGF-1R, указанное в настоящем описании.

Одним из объектов изобретения является клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело к IGF-1R, указанное в настоящем описании.

Одним из объектов изобретения является способ получения антитела к IGF-1R, указанного в настоящем описании, заключающийся в том, что культивируют клетку хозяина, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к IGF-1R, указанное в настоящем описании.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано

на фиг. 1 - результаты, демонстрирующие, что антитела, подвергнутые инженерии касательно их способности связываться с FcRn, характеризуются пролонгированным (YTE) или укороченным (AAA) временем полужизни *in vivo*, повышенной (YTE) или пониженной (AAA) способностью связываться с FcRn по сравнению с референс-антителом дикого типа (wt), по данным, полученным с помощью SPR-анализа, а также удлинённым или укороченным временем удерживания на содержащей FcRn хроматографической колонке; а) данные о ФК после однократного болюсного *i.v.*-введения в дозе 10 мг/кг трансгенным по huFcRn самца мышей линии C57BL/6J $\pm$ 276: данные о AUC для IgG дикого типа, а также для IgG с модифицированной с помощью YTE и AAA Fc-области; б) BIAcore-сенсограмма; в) результаты элюции из содержащей FcRn аффинной колонки; антитело к IGF-1R дикого типа (референс-стандарт), YTE-мутант антитела к IGF-1R, AAA-мутант антитела к IGF-1R;

на фиг. 2 - сравнительные данные о концентрациях в сыворотке после внутривенного введения антител к IGF-1R 0033, 0035 и 0045;

на фиг. 3 - сравнительные данные о концентрации в лизате глаза после интравитреального и внутривенного введения антитела к IGF-1R 0033;

на фиг. 4 - сравнительные данные о концентрации в лизате глаза после интравитреального и внутривенного введения антитела к IGF-1R 0035;

на фиг. 5 - сравнительные данные о концентрации в лизате глаза после интравитреального и внутривенного введения антитела к IGF-1R 0045.

Подробное описание вариантов осуществления изобретения

I. Определения.

Понятие "примерно" означает, что величина находится в пределах $\pm 20\%$ от указанного далее численного значения. В одном из вариантов осуществления изобретения понятие означает, что величина находится в пределах $\pm 10\%$ от указанного далее численного значения. В одном из вариантов осуществления изобретения понятие означает, что величина находится в пределах $\pm 5\%$ от указанного далее численного значения.

В контексте настоящего описания "акцепторный человеческий каркасный участок" означает каркасный участок, содержащий аминокислотную последовательность каркасного участка варибельного домена легкой цепи (VL) или каркасного участка варибельного домена тяжелой цепи (VH), происходящего из каркасного участка человеческого иммуноглобулина или консенсусного человеческого каркасного участка, указанного ниже. Акцепторный человеческий каркасный участок "происходящий из" каркасного участка человеческого иммуноглобулина или консенсусного человеческого каркасного участка, может содержать такую же аминокислотную последовательность или может содержать замены в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество аминокислотных замен составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность акцепторного человеческого каркасного участка VL идентична последовательности каркасного участка VL человеческого иммуноглобулина или последовательности консенсусного человеческого каркасного участка.

Антитело "с созревшей аффинностью" означает антитело с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких гиперварибельных участках (HVR) по сравнению с родительским антителом, которое не содержит указанных изменений, указанные изменения приводят к повышению аффинности антитела к антигену.

Понятие "изменение" означает мутацию (замена), инсерцию (добавление) или делецию одного или

нескольких аминокислотных остатков в родительском антителе или слитом полипептиде, например слитом полипептиде, который содержит по меньшей мере FcRn-связывающий фрагмент Fc-области, с получением модифицированного антитела или слитого полипептида. Понятие "мутация" означает, что конкретный аминокислотный остаток заменен на другой аминокислотный остаток. Например, мутация L234A означает, что аминокислотный остаток лизина в положении 234 в Fc-области антитела (полипептиде) заменен на аминокислотный остаток аланина (замена лизина на аланин) (нумерация согласно EU-индексу).

Понятие "аминокислотная мутация" означает замену по меньшей мере одного существующего аминокислотного остатка на другой отличный от него аминокислотный остаток (т.е. замещающий аминокислотный остаток).

Замещающий аминокислотный остаток может представлять собой "встречающиеся в естественных условиях аминокислотные остатки" и их выбирают из группы, включающей аланин (трехбуквенный код: ala, однобуквенный код: A), аргинин (arg, R), аспарагин (asn, N), аспарагиновую кислоту (asp, D), цистеин (cys, C), глутамин (gln, Q), глутаминовую кислоту (glu, E), глицин (gly, G), гистидин (his, H), изолейцин (ile, I), лейцин (leu, L), лизин (lys, K), метионин (met, M), фенилаланин (phe, F), пролин (pro, P), серин (ser, S), треонин (thr, T), триптофан (trp, W), тирозин (tyr, Y) и валин (val, V). Понятие "аминокислотная инсерция" означает (дополнительное) включение по меньшей мере одного аминокислотного остатка в предварительно определенное положение в аминокислотной последовательности. В одном из вариантов осуществления изобретения инсерция может представлять собой инсерцию одного или двух аминокислотных остатков. Встроенный(ые) аминокислотный остаток(и) может(гут) представлять собой любой встречающийся или не встречающийся в естественных условиях аминокислотный остаток.

Понятие "аминокислотная делеция" означает удаление по меньшей мере одного аминокислотного остатка в предварительно определенном положении в аминокислотной последовательности.

Понятия "антитело к IGF-1R" и "антитело, которое связывается с IGF-1R" относятся к антителу, которое обладает способностью связываться с IGF-1R с достаточной аффинностью, что позволяет применять антитело в качестве диагностического и/или терапевтического агента, направленного против IGF-1R. В одном из вариантов осуществления изобретения уровень связывания антитела к IGF-1R с неродственным, не представляющим собой IGF-1R белком составляет менее чем примерно 10% от связывания антитела с IGF-1R по данным, полученным, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В контексте настоящего описания понятие "антитело" используется в его наиболее широком смысле и относится к различным структурам антител, включая (но, не ограничиваясь только ими) моноклональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела и триспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антиген- и/или белок А, и/или FcRn-связывающей активностью.

Понятие "антитело, которое связывается с тем же эпитопом", что и референс-антитело, относится к антителу, которое блокирует связывание референс-антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более и, наоборот, референс-антитело блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более. Пример конкурентного анализа представлен в настоящем описании.

Понятие "асимметричная Fc-область" обозначает пару полипептидов Fc-области, которые имеют различные аминокислотные остатки в соответствующих положениях согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота.

Понятие "асимметричная Fc-область в отношении FcRn-связывания" относится к Fc-области, которая состоит из двух полипептидных цепей, которые имеют различные аминокислотные остатки в соответствующих положениях, где положения определяют согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота, при этом различные положения влияют на связывание Fc-области с человеческим неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Для целей настоящего описания различия между двумя полипептидными цепями Fc-области в "асимметричной Fc-области в отношении FcRn-связывания" не включают различия, интродуцированные для облегчения образования гетеродимерных Fc-областей, например, для получения биспецифических антител. Указанные различия также могут быть асимметричными, это означает, что две цепи имеют различия в несоответствующих аминокислотных остатках согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота. Такие различия облегчают гетеродимеризацию и снижают гомодимеризацию. Примерами таких различий являются так называемые замены типа "выступы во впадины", полученные с помощью технологии "knobs-into-holes" (обеспечение взаимодействия по типу "выступы во впадины") (см., например, US 7695936 и US 2003/0078385). Установлено, что следующие замены типа "выступы во впадины" в индивидуальных полипептидных цепях Fc-области антитела класса IgG подкласса IgG1 повышают образование гетеродимера: 1) Y407T в одной цепи и T366Y в другой цепи; 2) Y407A в одной цепи и T366W в другой цепи; 3) F405A в одной цепи и T394W в другой цепи; 4) F405W в одной цепи и T394S в другой цепи; 5) Y407T в одной цепи и T366Y в другой цепи; 6) T366Y и F405A в одной цепи и T394W и Y407T в другой цепи; 7) T366W и F405W в одной цепи и T394S и Y407A в другой цепи; 8) F405W и Y407A в одной цепи и T366W и T394S в другой цепи; и 9) T366W в одной цепи и T366S, L368A и Y407V в другой цепи, при этом последний вариант является наиболее приемлемым.

Кроме того, изменения, приводящие к созданию новых дисульфидных мостиков между двумя полипептидными цепями Fc-области, облегчают образование гетеродимера (см., например, US 2003/0078385). Кроме того, установлено, что следующие замены, приводящие к соответствующему пространственному расположению отдельных остатков цистеина, что обеспечивает образование новых внутрицепочечных дисульфидных связей в индивидуальных полипептидных цепях Fc-области антитела класса IgG подкласса IgG1, повышают формирование гетеродимера: Y349C в одной цепи и S354C в другой; Y349C в одной цепи и E356C в другой; Y349C в одной цепи и E357C в другой; L351C в одной цепи и S354C в другой; T394C в одной цепи и E397C в другой; или D399C в одной цепи и K392C в другой. Другими примерами аминокислотных замен, облегчающих гетеродимеризацию, являются так называемые "замены заряженных пар" (см., например, WO 2009/089004). Установлено, что следующие замены заряженных пар индивидуальных полипептидных цепей Fc-области антитела класса IgG подкласса IgG1 повышают формирование гетеродимера: 1) K409D или K409E в одной цепи и 399K или D399R в другой цепи; 2) K392D или K392E в одной цепи и D399K или D399R в другой цепи; 3) K439D или K439E в одной цепи и E356K или E356R в другой цепи; 4) K370D или K370E в одной цепи и E357K или E357R в другой цепи; 5) K409D и K360D в одной цепи плюс D399K и E356K в другой цепи; 6) K409D и K370D в одной цепи плюс D399K и E357K в другой цепи; 7) K409D и K392D в одной цепи плюс D399K, E356K и E357K в другой цепи; 8) K409D и K392D в одной цепи и D399K в другой цепи; 9) K409D и K392D в одной цепи и D399K и E356K в другой цепи; 10) K409D и K392D в одной цепи и D39K и D357K в другой цепи; 11) K409D и K370D в одной цепи и D399K и D357K в другой цепи; 12) D399K в одной цепи и K409D и K360D в другой цепи; и 13) K409D и K439D в одной цепи и D399K и E356K в другой.

Понятие "связывание с IGF-1R" относится к связыванию антитела с IGF-1R, установленному с помощью анализа *in vitro*, в одном из вариантов осуществления изобретения с помощью анализа связывания, при котором антитело связывается с поверхностью и связывание IGF-1R с антителом измеряют с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Связывание характеризуется аффинностью связывания (K_D), составляющей 10^{-8} М или менее, в некоторых вариантах осуществления от 10^{-13} до 10^{-9} М.

Связывание можно исследовать с помощью BIAcore-анализа (фирма GE-Healthcare, Уппсала, Швеция). Аффинность связывания оценивают в понятиях k_a (константа скорости ассоциации антитела в комплексе антитело/антиген), k_d (константа диссоциации) и K_D (k_d/k_a).

Связывание IGF-1 и IGF-2 с IGF-1R ингибируется также антителами, указанными в настоящем описании. Ингибирование измеряют в виде величины IC_{50} в анализе связывания IGF-1/IGF-2 с IGF-1R на опухолевых клетках. В таком анализе количество радиоактивно меченного IGF-1 или IGF-2 или их IGF-1R-связывающих фрагментов, связанных с IGF-1R, на поверхности опухолевых клеток (например, HT29) измеряют без антитела и в присутствии возрастающих концентраций антитела. Величины IC_{50} для антител, указанных в настоящем описании, характеризующие связывание IGF-1 и IGF-2 с IGF-1R, не превышают 2нМ, и соотношение величин IC_{50} , характеризующих связывание IGF-1/IGF-2 с IGF-1R, составляет примерно от 1:3 до 3:1. Величины IC_{50} измеряют в виде средних или медианных значений, полученных по меньшей мере по трем независимым измерениям. Отдельные величины IC_{50} могут выпадать из ряда. Аминокислотная последовательность человеческого IGF-1R представлена в SEQ ID NO: 11.

Понятие "химерное" антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из конкретного источника или конкретных видов, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или других видов.

Понятие "CH2-домен" относится к части полипептида тяжелой цепи антитела, которая простирается примерно от EU-положения 231 до EU-положения 340 (согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения CH2-домен имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 09: APELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVWDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQ ESTYRWSVLT VLNQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAIEKTIS KAK.

Понятие "CH3-домен" относится к части полипептида тяжелой цепи антитела, которая простирается примерно от EU-положения 341 до EU-положения 446 (согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения CH3-домен имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10: GQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG.

Понятие "класс" антитела относится к типу константного домена или константной области, который/которая входит в его тяжелую цепь. Известно пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и некоторые из них можно подразделять дополнительно на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулина, обозначают как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно.

Понятие "сопоставимая длина" означает, что два полипептида содержат идентичное количество аминокислотных остатков или могут отличаться по длине на один или несколько максимум вплоть до 10 аминокислотных остатков. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептиды Fc-области содержат идентичное количество аминокислотных остатков или отличаются 1-10 аминокислотными ос-

татами. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептиды Fc-области содержат идентичное количество аминокислотных остатков или отличаются 1-5 аминокислотными остатками. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептиды Fc-области содержат идентичное количество аминокислотных остатков или отличаются 1-3 аминокислотными остатками.

Понятие "происходящая из" означает, что аминокислотная последовательность происходит из родительской аминокислотной последовательности путем интродукции изменений по меньшей мере в одно положение. Так, аминокислотная последовательность, происходящая из родительской последовательности, отличается от соответствующей родительской аминокислотной последовательности по меньшей мере одним соответствующим положением (нумерация согласно нумерации на основе EU-индекса Кэбота для Fc-областей антител). В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность, происходящая из родительской аминокислотной последовательности, отличается 1-15 аминокислотными остатками в соответствующих положениях. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность, происходящая из родительской аминокислотной последовательности, отличается 1-10 аминокислотными остатками в соответствующих положениях. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность, происходящая из родительской аминокислотной последовательности, отличается 1-6 аминокислотными остатками в соответствующих положениях. Аналогично этому аминокислотная последовательность, происходящая из родительской последовательности, имеет высокую степень идентичности аминокислотной последовательности с ее родительской аминокислотной последовательностью. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность, происходящая из родительской аминокислотной последовательности, имеет 80%-ную или более высокую идентичность аминокислотной последовательности. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность, происходящая из родительской аминокислотной последовательности, имеет 90%-ную или более высокую идентичность аминокислотной последовательности. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность, происходящая из родительской аминокислотной последовательности, имеет 95%-ную или более высокую идентичность аминокислотной последовательности.

Понятие "эффекторные функции" относится к тем видам биологической активности, которые связаны с Fc-областью антитела, которые варьируются в зависимости от класса антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора) и активацию B-клеток.

Понятие "эффективное количество" агента, например фармацевтической композиции, означает количество, эффективное в дозах и в течение периода времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата.

Понятие "слитый с Fc полипептид" означает слияние связывающего домена (например, антигенсвязывающего домена, такого как одноцепочечное антитело, или полипептида, такого как лиганд или рецептор) с Fc-областью антитела, который обладает требуемой активностью связывания с мишенью и/или белком A, и/или FcRn.

Понятие "Fc-область человеческого происхождения" относится к C-концевой области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть шарнирной области, CH2-домен и CH3-домен. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается с Cys226 или с Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-область имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. Однако C-концевой лизин (Lys447) Fc-области может присутствовать или отсутствовать. Если специально не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, которую обозначают так же как EU-индекс, описанной у Kabat E.A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, NIH публикация 91-3242. Fc-область состоит из двух полипептидов тяжелой цепи Fc-области, которые ковалентно связаны друг с другом через остатки цистеина шарнирной области, образующих межполипептидные дисульфидные связи.

Понятие "FcRn" означает человеческий неонатальный Fc-рецептор. Функцией FcRn является "спасение" IgG от лизосомального пути расщепления, что приводит к пониженному клиренсу и удлинению времени полужизни. FcRn представляет собой гетеродимерный белок, состоящий из двух полипептидов: имеющего молекулярную массу 50 кДа белка, напоминающего белок главного комплекса гистосовместимости класса I (α -FcRn), и имеющего молекулярную массу 15 кДа β 2-микроглобулина (β 2m). FcRn связывается с высокой аффинностью с CH2-CH3-участком Fc-областей IgG. Взаимодействие между IgG и FcRn строго зависит от значения pH и имеет место при стехиометрическом соотношении 1:2, при этом один IgG связывается с двумя молекулами FcRn через две тяжелые цепи (Huber A.H. и др., *J. Mol. Biol.* 230, 1993, сс. 1077-1083). FcRn-связывание происходит в эндосоме при кислом значении pH (pH <6,5) и IgG высвобождается на клеточной поверхности с нейтральным pH (pH примерно 7,4). Чувствительная к значению pH природа взаимодействия облегчает опосредуемую FcRn защиту проникающих в клетки

посредством пиноцитоза IgG от внутриклеточного расщепления путем связывания с рецептором в кислой среде эндосом. Затем FcRn облегчает рециклинг IgG на клеточную поверхность и последующее высвобождение в кровотоке после воздействия на комплекс FcRn-IgG среды с нейтральным pH вне клетки.

Понятие "FcRn-связывающий участок Fc-области" означает часть полипептида тяжелой цепи антитела, которая простирается примерно от EU-положения 243 до EU-положения 261, и примерно от EU-положения 275 до EU-положения 293, и примерно от EU-положения 302 до EU-положения 319, и примерно от EU-положения 336 до EU-положения 348, и примерно от EU-положения 367 до EU-положения 393, и в EU-положении 408, и примерно от EU-положения 424 до EU-положения 440. В одном из вариантов осуществления изобретения один или несколько следующих аминокислотных остатков согласно EU-нумерации Кэбота изменены: F243, P244, P245 P, K246, P247, K248, D249, T250, L251, M252, I253, S254, R255, T256, P257, E258, V259, T260, C261, F275, N276, W277, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, P291, R292, E293, V302, V303, S304, V305, L306, T307, V308, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, G316, K317, E318, Y319, I336, S337, K338, A339, K340, G341, Q342, P343, R344, E345, P346, Q347, V348, C367, V369, F372, Y373, P374, S375, D376, I377, K378, V379, E380, W381, E382, S383, N384, G385, Q386, P387, E388, N389, Y391, T393, S408, S424, C425, S426, V427, M428, H429, E430, A431, L432, H433, N434, H435, Y436, T437, Q438, K439 и S440 (EU-нумерация).

Понятие "каркасный участок" или "FR", означает аминокислотные остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельного участка (HVR). FR вариабельного домена, как правило, состоит из четырех FR-доменов FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, имеют следующее расположение в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Понятия "полноразмерное антитело" в контексте настоящего описания обозначает антитело, имеющее структуру, практически сходную с нативной структурой антитела, или имеющее тяжелые цепи, которые содержат представленную в настоящем описании Fc-область. Полноразмерное антитело может содержать дополнительные домены, такие, например, как scFv или scFab, конъюгированные с одной или несколькими цепями полноразмерного антитела. Указанные конъюгаты подпадают также под понятие "полноразмерное антитело".

Понятия "гетеродимер" или "гетеродимерная" означает молекулу, которая содержит две полипептидные цепи (например, сопоставимой длины), в которой две полипептидные цепи имеют аминокислотную последовательность, которая содержит по меньшей мере один другой аминокислотный остаток в соответствующем положении, где соответствующее положение определяют согласно EU-индексу Кэбота.

Понятия "гомодимер" или "гомодимерная" означает молекулу, которая содержит две полипептидные цепи (например, сопоставимой длины), в которой две полипептидные цепи имеют аминокислотную последовательность, которая является идентичной в соответствующих положениях, где соответствующие положения определяют согласно EU-индексу Кэбота.

Антитело, представленное в настоящем описании, может быть гомодимерным или гетеродимерным касательно Fc-области, что определяют на основе представляющих интерес мутаций или свойств. Например, касательно связывания FcRn и/или белка A (т.е. представляющих интерес свойств) Fc-область (антитело) является гомодимерной (т.е. оба полипептида Fc-области тяжелой цепи содержат указанные мутации) касательно мутаций H310A, H433A и Y436A (эти мутации представляют интерес касательно способности к связыванию FcRn и/или белка A Fc-области слитого белка или антитела), но в то же время является гетеродимерной касательно мутаций Y349C, T366S, L368A и Y407V (эти мутации не представляют интерес, поскольку эти мутации связаны с гетеродимеризацией тяжелых цепей, а не со способностью связывать FcRn/белок A), а также касательно мутаций S354C и T366W соответственно (первая содержится только в первом полипептиде Fc-области, а вторая содержится только во втором полипептиде Fc-области). Кроме того, например, антитело, представленное в настоящем описании, может быть гетеродимерным касательно мутаций I253A, H310A, H433A, H435A и Y436A (т.е. все эти мутации влияют на способность к связыванию FcRn и/или белка A димерного полипептида), т.е. один полипептид Fc-области содержит мутации I253A, H310A и H435A, а другой полипептид Fc-области содержит мутации H310A, H433A и Y436A.

Понятия "клетка-хозяин", "клеточная линия-хозяин" и "клеточная культура-хозяин" используются взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. К клеткам-хозяевам относятся "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первично трансформированную клетку и полученное из нее потомство безотносительно к количеству пересевов. Потомство может не быть полностью идентичным по составу нуклеиновых кислот родительской клетке, но может содержать мутации. Под объем изобретения подпадает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, которая обнаружена в результате скрининга или отобрана у исходной трансформированной клетки.

"Человеческое антитело" представляет собой антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого человеком или человеческой клеткой, или происходящую из источника, отличного от человека, с использованием спектра чело-

веческих антител или других кодирующих человеческое антитело последовательностей. Из указанного определения человеческого антитела специально исключено гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

"Человеческий консенсусный каркасный участок" представляет собой каркасный участок, в который входят наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в выбранных последовательностях каркасных участков VL или VH человеческого иммуноглобулина. Как правило, выбор последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина осуществляют из подгруппы последовательностей вариабельных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, описанную у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., NIH Publication 91-3242, Bethesda MD, тт. 1-3, 1991. В одном из вариантов осуществления изобретения касательно VL подгруппа представляет собой подгруппу к I согласно Kabat и др., выше. В одном из вариантов осуществления изобретения касательно VH подгруппа представляет собой подгруппу III согласно Kabat и др., выше.

Понятие "полипептид человеческой Fc-области" означает аминокислотную последовательность, идентичную «нативному» полипептиду или полипептиду «дикого типа» человеческой Fc-области. Понятие «полипептид варианта (человеческой) Fc-области» означает аминокислотную последовательность, которая происходит из "нативного" полипептида или полипептида "дикого типа" человеческой Fc-области с помощью по меньшей мере одного "аминокислотного изменения". "Человеческая Fc-область" состоит из двух полипептидов человеческой Fc-области. "Вариант (человеческой) Fc-области" состоит из двух полипептидов Fc-области, при этом оба могут представлять собой полипептиды варианта (человеческой) Fc-области или один может представлять собой полипептид человеческой Fc-области, а другой представлять собой полипептид варианта (человеческой) Fc-области. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид человеческой Fc-области имеет аминокислотную последовательность полипептида Fc-области человеческого IgG1 SEQ ID NO: 14 или полипептида Fc-области человеческого IgG2 SEQ ID NO: 15, или полипептида Fc-области человеческого IgG3 SEQ ID NO: 16, полипептида Fc-области человеческого IgG4 SEQ ID NO: 17. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид Fc-области выводят из полипептида Fc-области, имеющего SEQ ID NO: 14, или 15, или 16, или 17, и он имеет по меньшей мере одну аминокислотную мутацию по сравнению с полипептидом Fc-области, имеющим SEQ ID NO: 14, или 15, или 16, или 17. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид Fc-области содержит/имеет от примерно 1 до примерно 10 аминокислотных мутаций и в одном из вариантов осуществления изобретения от примерно 1 до примерно 5 аминокислотных мутаций. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид Fc-области имеет примерно 80%-ную гомологию с полипептидом человеческой Fc-области, имеющим SEQ ID NO: 14, или 15, или 16, или 17. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид Fc-области имеет примерно 90%-ную гомологию с полипептидом человеческой Fc-области, имеющим SEQ ID NO: 14, или 15, или 16, или 17. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид Fc-области имеет примерно 95%-ную гомологию с полипептидом человеческой Fc-области, имеющим SEQ ID NO: 14, или 15, или 16, или 17.

Полипептид Fc-области, происходящий из полипептида человеческой Fc-области, имеющего SEQ ID NO: 14, или 15, или 16, или 17, определяют по имеющимся аминокислотным изменениям. Так, например, понятие P329G означает полипептид Fc-области, происходящий из полипептида человеческой Fc-области, который имеет мутацию, приводящую к замене пролина на глицин в аминокислотном положении 329, относительно полипептида человеческой Fc-области, имеющего SEQ ID NO: 14, или 15, или 16, или 17.

В контексте настоящего описания аминокислотные положения всех константных областей и доменов тяжелой и легкой цепи нумеруют согласно системе нумерации Кэбота, описанной у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, и обозначают в контексте настоящего описания как "нумерация согласно Кэботу". В частности, систему нумерации по Кэботу (см. сс. 647-660) у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, применяют для константного домена легкой цепи CL κ - и λ -изотипа, а систему нумерации по Кэботу на основе EU-индекса (см. сс. 661-723) применяют для константных доменов тяжелой цепи (CH1, шарнир, CH2 и CH3).

Полипептид Fc-области человеческого IgG1 имеет следующую аминокислотную последовательность:

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14).
```

Происходящий из Fc-области человеческого IgG1 полипептид Fc-области с мутациями L234A, L235A имеет следующую аминокислотную последовательность:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 HYTEKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG1 полипептид Fc-области с мутациями Y349C, T366S, L368A и Y407V имеет следующую аминокислотную последовательность:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 HYTEKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG1 полипептид Fc-области с мутациями S354C, T366W имеет следующую аминокислотную последовательность:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 HYTEKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 20).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG1 полипептид Fc-области с мутациями L234A, L235A и с мутациями Y349C, T366S, L368A, Y407V имеет следующую аминокислотную последовательность:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 HYTEKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 21).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG1 полипептид Fc-области с мутациями L234A, L235A и S354C, T366W имеет следующую аминокислотную последовательность:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 HYTEKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 22).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG1 полипептид Fc-области с мутацией P329G имеет следующую аминокислотную последовательность:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 HYTEKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 23).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG1 полипептид Fc-области с мутациями L234A, L235A и мутацией P329G имеет следующую аминокислотную последовательность:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 HYTEKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG1 полипептид Fc-области с мутацией P329G и мутациями Y349C, T366S, L368A, Y407V имеет следующую аминокислотную последовательность:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 HYTEKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG1 полипептид Fc-области с мутацией P329G и мутациями S354C, T366W имеет следующую аминокислотную последовательность:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
 NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG1 олиопептид Fc-области с мутациями L234A, L235A, P329G и Y349C, T366S, L368A, Y407V имеет следующую аминокислотную последовательность:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
 NYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 27).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG1 полипептид Fc-области с мутациями L234A, L235A, P329G и мутациями S354C, T366W имеет следующую аминокислотную последовательность:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
 NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 28).

Полипептид Fc-области человеческого IgG4 имеет следующую аминокислотную последовательность:

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
 QFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 17).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG4 полипептид Fc-области с мутациями S228P и L235E имеет следующую аминокислотную последовательность:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
 QFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 29).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG4 полипептид Fc-области с мутациями S228P, L235E и мутацией P329G имеет следующую аминокислотную последовательность:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
 QFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 30).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG4 полипептид Fc-области с мутациями S354C, T366W имеет следующую аминокислотную последовательность:

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
 QFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 31).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG4 полипептид Fc-области с мутациями Y349C, T366S, L368A, Y407V имеет следующую аминокислотную последовательность:

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
 QFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSRILTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 32).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG4 полипептид Fc-области с мутациями S228P, L235E и S354C, T366W имеет следующую аминокислотную последовательность:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL
HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 33).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG4 полипептид Fc-области с мутациями S228P, L235E и Y349C, T366S, L368A, Y407V имеет следующую аминокислотную последовательность:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQVSLCAVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL
HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 34).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG4 полипептид Fc-области с мутацией P329G имеет следующую аминокислотную последовательность:

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL
HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 35).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG4 полипептид Fc-области с мутациями P329G и Y349C, T366S, L368A, Y407V имеет следующую аминокислотную последовательность:

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQVSLCAVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL
HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 36).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG4 полипептид Fc-области с мутациями P329G и S354C, T366W имеет следующую аминокислотную последовательность:

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL
LHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 37).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG4 полипептид Fc-области с мутациями S228P, L235E, P329G и Y349C, T366S, L368A, Y407V имеет следующую аминокислотную последовательность:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQVSLCAVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL
HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 38).

Происходящий из Fc-области человеческого IgG4 полипептид Fc-области с мутациями S228P, L235E, P329G и мутацией, приводящей к образованию «выступа», имеет следующую аминокислотную последовательность:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL
LHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 39).

Результаты сравнительного анализа первичной структуры различных
человеческих Fc-областей представлены ниже (EU-нумерация):

```

      2      2
      3      5
      0      0
IGG1  DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
IGG2  ...VECPPCP APP.VAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
IGG3  DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
IGG4  ...PPCPSCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
-- шарнир -|-- CH2 -----
              3
              0
IGG1  PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
IGG2  PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK
IGG3  PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
IGG4  PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
-- CH2 -----
              3
              5
              0
IGG1  CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK
IGG2  CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
IGG3  CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
IGG4  CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
-- CH2 ----- CH2 --|-- CH3 -----
              4
              0
              0
IGG1  GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
IGG2  GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
IGG3  GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
IGG4  GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
-- CH3 -----
              4
              4
              7
IGG1  NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK
IGG2  NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK
IGG3  NIFSCSVME ALHNRYTQKS LSLSPGK
IGG4  NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK
-- CH3 -----|

```

Понятие "гуманизированное" антитело относится к химерному антителу, которое содержит аминокислотные остатки из нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированное антитело может содержать практически все из но меньшей мере одного и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют участкам нечеловеческого антитела, а все или практически все FR соответствуют участкам человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящей из человеческого антитела. Понятие "гуманизированная форма" антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подвергали гуманизации.

Понятие "гипервариабельный участок" или "HVR" в контексте настоящего описания относится к каждому из участков вариабельного домена антитела, последовательности которых являются гипервариабельными ("определяющие комплементарность участки" или "CDR") и/или формируют петли определенной структуры ("гипервариабельные петли"), и/или содержат контактирующие с антигеном остатки ("контакты с антигеном"). Как правило, антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). В контексте настоящего описания HVR включают:

(а) гипервариабельные петли, включающие аминокислотные остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia C. и Lesk A.M., J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917);

(б) CDR, включающие аминокислотные остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, публикация NIH 91-3242);

(в) области контакта с антигеном, включающие аминокислотные остатки 27с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum и др., J. Mol. Biol. 262, 1996, сс. 732-745); и

(г) комбинации остатков, указанных в подпунктах (а), (б) и/или (в), включающие аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

В одном из вариантов осуществления изобретения HVR-остатки включают остатки, указанные в настоящем описании.

Если не указано иное, то HVR-остатки и другие остатки в вариабельном домене (например, FR-остатки) нумеруют в настоящем описании согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота (Kabat и др., выше).

"Индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающее. К млекопитающим относятся (но

не ограничиваясь только ими) одомашненные животные (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматы (например, люди и приматы кроме человека, например обезьяны), кролики и грызуны (например, мыши и крысы). В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидиум или субъ-ект представляет собой человека.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое отделено от компонента его естественного окружения. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело очищают до чистоты, превышающей 95 или 99% по данным, например, электрофоретических анализов (таких, например, как ДСН-ПААГ, изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), капиллярный электрофорез) или хроматографических анализов (таких, например, как ионообменная хроматография или ЖХВР с обращенной фазой). Обзор методов оценки чистоты антител см., например, у Flatman S. и др., J. Chrom. B 848, 2007, сс. 79-87.

"Выделенная" нуклеиновая кислота представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая отделена от компонента ее естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая в норме включает молекулу нуклеиновой кислоты, но в которой молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или в которой ее локализация на хромосоме отличается от ее встречающейся в естественных условиях локализации на хромосоме.

Понятие "выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к IGF-1R" относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и легкие цепи антитела (или их фрагменты), включая указанную(ые) молекулу(ы) в одной плазмиде или в различных плаزمиде, и указанную(ые) молекулу(ы) нуклеиновой(ых) кислоты(т), присутствующую(ие) в одной или нескольких положениях в клетке-хозяине.

Понятие "моноклональное антитело" в контексте настоящего описания относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, входящие в популяцию, идентичны и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например, содержащих мутации, встречающиеся в естественных условиях или возникающих в процессе производства препарата моноклонального антитела, указанные варианты, как правило, присутствуют в минорных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела к различным детерминантам (эпитопам), каждое моноклональное антитело из препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты антигена. Таким образом, прилагательное "моноклональный" определяет особенность антитела, характеризуя его как полученное из практически гомогенной популяции антител, а не сконструированное в соответствии с требованиями к получению антитела с помощью какого-либо конкретного метода. Например, моноклональные антитела, которые можно применять согласно настоящему изобретению, можно создавать с помощью различных технологий, включая (но не ограничиваясь только ими) метод гибридом, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы с использованием трансгенных животных, которые содержат все или часть локусов иммуноглобулина, указанные методы и другие приведенные в качестве примера методы получения моноклональных антител представлены в настоящем описании.

Понятие "нативные антитела" относится к встречающимся в естественных условиях молекулам иммуноглобулинов с различными структурами. Например, нативные антитела в виде IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. Начиная с N-конца к C-концу, каждая тяжелая цепь имеет переменную область (VH), которую называют также переменным тяжелым доменом или переменным доменом тяжелой цепи, за которой следует три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогично этому, начиная с N-конца к C-концу, каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), которую называют также переменным легким доменом или переменным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL). Легкая цепь антитела может принадлежать к одному из двух типов, называемых κ и λ , в зависимости от аминокислотной последовательности ее константного домена.

Понятие "листовка-вкладыш в упаковку" относится к инструкциям, которые обычно входят в поступающие в продажу упаковки терапевтических продуктов, содержащим информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или мерах предосторожности, которые связаны с применением указанных терапевтических продуктов.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивая последовательностей и при необходимости интродукции брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и не рассматривая какие-либо консервативные замены в качестве компонента при оценке идентичности последовательностей. Сравнительный анализ для целей определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, известными в данной области, используя, например, публично доступные компьютерные программы, такие как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры

для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей настоящего изобретения величины % идентичности аминокислотных последовательностей получают, используя компьютерную программу для сравнения последовательностей ALIGN-2. Авторство компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2 принадлежит фирме Genentech, Inc., и исходный код был представлен в комплекте с документацией для пользователей в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20359, где он зарегистрирован как U.S. Copyright Registration № TXU510087. Программа ALIGN-2 публично доступна от фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния, или ее можно компилировать на основе исходного кода. Программу ALIGN-2 можно компилировать для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую систему UNIX V4.0D. Все параметры, требуемые для сравнения последовательностей, устанавливаются программой ALIGN-2 и не должны изменяться. В ситуациях, в которых ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей данной аминокислотной последовательности А по сравнению, с или относительно данной аминокислотной последовательности В (что в альтернативном варианте можно обозначать как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с или относительно данной аминокислотной последовательности В), рассчитывают следующим образом:

$$100 \times \text{дробь } X/Y,$$

где X обозначает количество аминокислотных остатков, определенных как идентичные совпадения при оценке с помощью программы для сравнительного анализа последовательностей ALIGN-2, где с помощью программы осуществляли сравнение А и В, и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в В. Должно быть очевидно, что, если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % идентичности аминокислотных последовательностей А относительно В не может быть равен % идентичности аминокислотной последовательности В относительно А. Если специально не указано иное, то все величины % идентичности аминокислотных последовательностей, указанные в настоящем описании, получали с использованием описанной в предыдущем параграфе компьютерной программы ALIGN-2.

Понятие "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, что он обеспечивает биологическую активность входящего в его состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью, и который не содержит дополнительных компонентов, обладающих неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому следует вводить композицию.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемые носители включают (но не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В контексте изобретения под "пептидным линкером" понимают пептид, содержащий аминокислотные последовательности, который предпочтительно имеет синтетическое происхождение. В одном из вариантов осуществления изобретения пептидный линкер представляет собой пептид, аминокислотная последовательность которого состоит по меньшей мере из 30 аминокислот, предпочтительно из 32-50 аминокислот. В одном из вариантов осуществления изобретения пептидный линкер представляет собой пептид, аминокислотная последовательность которого состоит из 32-40 аминокислот. В одном из вариантов осуществления изобретения пептидный линкер представляет собой $(G_xS)_n$, где G = глицин, S = серин, (x = 3, n = 8, 9 или 10) или (x = 4 и n = 6, 7 или 8), в одном из вариантов осуществления изобретения x = 4, n = 6 или 7, в одном из вариантов осуществления изобретения x = 4, n = 7. В одном из вариантов осуществления изобретения пептидный линкер представляет собой $(G_4S)_6G_2$.

В контексте настоящего описания понятие "рекомбинантное антитело" относится ко всем антителам (химерным, гуманизированным и человеческим), которые получают, экспрессируют, создают или выделяют методами рекомбинации. Оно включает антитела, выделенные из клетки-хозяина, такой как NSO- или CHO-клетка, или из животного (например, мыши), которое является трансгенным по человеческим генам иммуноглобулина, или антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантной экспрессионной плазмиды, которой трансфектируют клетку-хозяина. Такие рекомбинантные антитела имеют переменные и константные области в преобразованной форме. Рекомбинантные антитела, представленные в настоящем описании, можно подвергать соматической гипермутации *in vivo*. Таким образом, аминокислотные последовательности VH- и VL-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые хотя происходят из последовательностей VH и VL человеческой зародышевой линии или являются родственными им, могут не существовать в естественных условиях в спектре антител человеческой зародышевой линии *in vivo*.

В контексте настоящего описания понятие "IGF-1R" относится к любой нативной форме IGF-1R из любого позвоночного животного, включая, если не указано иное, млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы). Понятие включает "полноразмерный" непротессированный IGF-1R, а также любую форму IGF-1R, полученную в результате процессинга в клетке. Понятие относится также к встречающимся в естественных условиях вариантам IGF-1R, например

сплайсинговым вариантам или аллельным вариантам. Аминокислотная последовательность человеческого IGF-1R представлена в SEQ ID NO: 11.

В контексте настоящего описания понятие "лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "процесс лечения") относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики, либо в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезни и ремиссия или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

Понятие "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гипервариабельных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., *Kuby Immunology*, 6-е изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для обеспечения специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, можно выделять, используя VH- или VL-домен из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных VL- или VH-доменов соответственно (см., например, Portolano и др., *J. Immunol.* 150, 1993, сс. 880-887; Clarkson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628).

Понятие "сосудистое глазное заболевание" включает (но не ограничиваясь только ими) синдромы внутриглазной неоваскуляризации, такие как диабетическая ретинопатия, диабетический отек желтого пятна, ретролентальная фиброплазия, неоваскулярная глаукома, окклюзии вен сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, дегенерация желтого пятна, возрастная дегенерация желтого пятна, пигментный ретинит, ретиальная ангиоматозная пролиферация, телеангиэктазия желтого пятна, ишемическая ретинопатия, неоваскуляризация радужной оболочки, внутриглазная неоваскуляризация, неоваскуляризация роговицы, неоваскуляризация сетчатки, хороидальная неоваскуляризация и дегенерация сетчатки (Garner A., *Vascular diseases*, в *Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach*, под ред. Garner A. и Klintworth G.K., 2-е изд., изд-во Marcel Dekker, New York, 1994, сс. 1625-1710).

Понятие "плазмида" в контексте настоящего описания относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая может обеспечивать воспроизводство другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Под указанное понятие подпадает плазмида в виде самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также плазмида, встроенная в геном клетки-хозяина, в которую она интродуцирована. Некоторые плазмиды обладают способностью оказывать направленное воздействие на экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Указанные плазмиды в контексте настоящего описания обозначают как "экспрессионные плазмиды".

Понятие "с мутацией IHH-AAA" ("IHH-AAA-мутация") в контексте настоящего описания относится к комбинации мутаций I253A (Ile253Ala), H310A (His310Ala) и H435A (His435Ala), и понятие "с мутацией HHY-AAA" ("HHY-AAA-мутация") в контексте настоящего описания относится к комбинации мутаций H310A (His310Ala), H433A (His433Ala) и Y436A (Tyr436Ala), и понятие "с мутацией YTE" ("YTE-мутация") в контексте настоящего описания относится к комбинации мутаций M252Y (Met252Tyr), S254T (Ser254Thr) и T256E (Thr256Glu) в константной области тяжелой цепи IgG1- или IgG4-подкласса, где нумерация соответствует EU-индексу Кэбота.

Понятие "с мутациями P329G LALA" ("P329G LALA-мутации") в контексте настоящего описания относится к комбинации мутаций L234A (Leu234Ala), L235A (Leu235Ala) и P329G (Pro329Gly) в константной области тяжелой цепи IgG1-подкласса, где нумерация соответствует EU-индексу Кэбота. Понятие "с мутацией SPLE" ("SPLE-мутация") в контексте настоящего описания относится к комбинации мутаций S228P (Ser228Pro) и L235E (Leu235Glu) в константной области тяжелой цепи IgG4-подкласса, где нумерация соответствует EU-индексу Кэбота. Понятие "с мутацией SPLE и P329G" ("SPLE и P329G-мутация") в контексте настоящего описания относится к комбинации мутаций S228P (Ser228Pro), L235E (Leu235Glu) и P329G (Pro329Gly) в константной области тяжелой цепи IgG4-подкласса, где нумерация соответствует EU-индексу Кэбота.

II. Композиции и способы.

Изобретение базируется, по меньшей мере частично, на открытие того, что антитела к IGF-1R с элиминированной способностью связываться с FcRn можно применять для лечения связанных с IGF-1R нарушений в глазу (сосудистые глазные заболевания). Конкретными, вариантами осуществления изобретения являются антитела, связывающиеся с IGF-1R, у которых элиминирована способность связываться с FcRn. Антитела, указанные в настоящем описании, можно применять, например, для диагностирования или лечения сосудистых глазных заболеваний.

Изобретение базируется, по меньшей мере частично, на открытие того, что специфические мутации

или комбинации мутаций, которые влияют на связывание Fc-области иммуноглобулина с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), т.е. которые уменьшают или даже элиминируют связывание Fc-области с FcRn, не элиминируют одновременно связывание Fc-области с белком А стафилококков. Это оказывает очень большое действие на процесс очистки, который можно применять, поскольку ему не требуется ограничение в зависимости от специфичности и вида, характерное для материалов для аффинной хроматографии, таких, например, как КарраSelect™, которые связываются только с антителами, содержащими легкую к-цепь. Таким образом, с помощью мутаций, указанных в настоящем описании, можно одновременно уменьшать или даже элиминировать связывание с FcRn, сохраняя при этом способность связываться с белком А.

Изобретение базируется, по меньшей мере частично, на открытии того, что путем применения различных мутаций в каждом из полипептидов Fc-области можно получать Fc-область гетеродимерной молекулы, такой, например, как биспецифическое антитело, которая, с одной стороны, имеет пониженную или даже элиминированную способность связываться с FcRn, но, с другой стороны, сохраняет способность связываться с белком А стафилококков. Указанное связывание с белком А можно применять для отделения гетеродимерного антитела от гомодимерных побочных продуктов. Например, путем объединения мутаций I253A, H310A и H435A в одном полипептиде Fc-области с мутациями H310A, H433A и Y436A в другом полипептиде Fc-области с использованием подхода "knobs-into-hole" можно получать гетеродимерную Fc-область, которая, с одной стороны, не связывается с FcRn (обе группы мутаций являются "молчащими" касательно человеческого FcRn), но сохраняют способность связываться с белком А стафилококков (полипептид Fc-области с мутациями I253A, H310A и H435A не связывается с FcRn и не связывается с белком А, а полипептид Fc-области с мутациями H310A, H433A и Y436A не связывается с FcRn, но все еще сохраняет способность связываться с белком А). В результате можно использовать стандартную аффинную хроматографию на белке А для удаления гомодимерных, несущих конструкцию типа "впадина-впадина" побочных продуктов, поскольку они уже не могут связываться с белком А. Таким образом, путем объединения подхода "knobs-into-holes" с мутациями I253A, H310A и H435A в несущей "впадину" цепи (цепь с "впадиной") и мутациями H310A, H433A и Y436A в несущей "выступы" цепи (цепь с "выступом") можно облегчать очистку/разделение гетеродимерного, несущего "выступы во впадинах" продукта, от гомодимерного, несущего конструкцию типа "впадина-впадина" побочного продукта.

Комбинация мутаций I253A, H310A, H435A или L251D, L314D, L432D, или L251S, L314S, L432S приводит к утрате способности связываться с белком А, а комбинация мутаций I253A, H310A, H435A или H310A, H433A, Y436A, или L251D, L314D, L432D приводит к утрате способности связываться с человеческим неонатальным Fc-рецептором.

В представленной ниже таблице приведен в качестве примера обзор аминокислотных остатков в Fc-области, которые вовлечены во взаимодействия или изменены для модификации взаимодействий.

Остаток	Взаимодействие с		KiH		Связывание с белком А	Воздействие мутаций на FcRn-связывание
	белком А	FcRn	«выступ»	«впадина»		
Pro238						P238A: повышение
Thr250						T250Q/M428L: повышение
Leu251	контакт основных цепей					
Met252	гидрофобная упаковка					M252W: повышение; M252Y: повышение; M252Y/T256Q: повышение; M252F/T256D: повышение; M252Y/S254T/T256E: повышение

Ile253	контакт основных цепей; водородное связывание; существенное снижение связывания, если имеет место мутация на Ala	взаимодействие				I253A: снижение
Ser254	полярное взаимодействие; водородное связывание					S254A: снижение; M252Y/S254T/T256E: повышение
Arg255	солевой мостик					R255A: снижение
Thr256						T256A: повышение; T256Q: повышение; T256P: повышение; M252Y/T256Q: снижение; M252F/T256D: снижение; M252Y/S254T/T256E: повышение
Pro257						P257I/Q311I: повышение; P257I/N434H: повышение
Glu272						E272A: повышение
Asp280						D280K: повышение
His285						снижение
Lys288						K288A: снижение; K288A/N434A: повышение
Val305						V305A: повышение
Thr307						T307A: повышение; T307A/E380A/N434A: повышение; T307Q/N434A: повышение; T307Q/N434S: повышение; T307Q/E380A/N434A: повышение
Val308						V308P/N434A: повышение
Leu309						L309A: снижение
His310		взаимодействие				H310A: снижение; H310Q/H433N: снижение
Gln311	полярное взаимодействие или взаимодействие зарядов					Q311A: повышение; P257I/Q311I: повышение
Asp312						D312A: повышение
Leu314	гидрофобное взаимодействие					
Lys317						K317A: повышение
Ala339						A339T: повышение
Tyr349				Y349C		
Ser354			S354C			
Thr366			T366W	T366S		
Leu368				L368A		

Asp376						D376A: повышение; D376V/N434H: повышение
Ala378						A378Q: повышение
Glu380	солевой мостик					E380A: повышение E380A/N434A: повышение; T307A/E380A/N434A: повышение; T307Q/E380A/N434A: повышение
Glu382						E382A: повышение
Gly385						G385H: повышение; G385A/Q386P/N389S: повышение
Gln386						G385A/Q386P/N389S: повышение
Asn389						G385A/Q386P/N389S: повышение
Tyr407				Y407V		
Ser415						S415A: снижение
Ser424						S424A: повышение
Met428						M428L: повышение; T250Q/M428L: повышение
Leu432	полярное взаимодействие или взаимодействие зарядов					
His433	полярное взаимодействие или взаимодействие зарядов; солевой мостик	взаимодействие				H433A: снижение; H310Q/H433N: снижение; H433K/N434F/Y436H: повышение; H433R/N434Y/Y436H: повышение; H433K/N434F: повышение
Asn434	водородное связывание; существенное снижение связывания, если имеет место замена на Ala	взаимодействие				N434W/Y/F/A/H: повышение; K288A/N434A: повышение; E380A/N434A: повышение; T307A/E380A/N434A: повышение; N434F/Y436H: повышение; H433K/N434F/Y436H: повышение; H433R/N434Y/Y436H: повышение; H433K/N434F: повышение; P257I/N434H: повышение; D376V/N434H: повышение; T307Q/N434A: повышение; T307Q/N434S: повышение; V308P/N434A: повышение; T307Q/E380A/N434A: повышение
His435	гидрофобная упаковка; существенное снижение связывания, если имеет место мутация на Ala	взаимодействие			H435R/Y436F элиминирует связывание с белком А	H435A: снижение; H435R: снижение
Tyr436	гидрофобная упаковка; существенное снижение связывания, если имеет место замена на Ala	взаимодействие			H435R/Y436F элиминирует связывание с белком А	Y436A: снижение; N434F/Y436H: повышение; H433K/N434F/Y436H: повышение; H433R/N434Y/Y436H: повышение

Модификации/мутации, указанные в настоящем описании, изменяют специфичность связывания в отношении одного или нескольких Fc-рецепторов, таких как человеческий FcRn. В то же время некоторые мутации, которые изменяют связывание с человеческим FcRn, не изменяют связывание с белком А.

В конкретных вариантах осуществления изобретения мутации могут изменять или существенно изменять время полужизни антитела в сыворотке по сравнению с соответствующим антителом без указан-

ных мутаций. В одном из вариантов осуществления изобретения мутации также не изменяют или не изменяют существенно связывание антитела с белком А по сравнению с соответствующим антителом, у которого отсутствуют указанные мутации.

А. Неонатальный Fc-рецептор (FcRn).

Неонатальный Fc-рецептор (FcRn) играет важную роль в метаболической "судьбе" антител IgG-класса *in vivo*. Функции FcRn включают "спасение" IgG дикого типа от пути расщепления лизосомами, что приводит к пониженному клиренсу и удлинению времени полужизни. Он представляет собой гетеродимерный белок, состоящий из двух полипептидов: имеющего молекулярную массу 50 кДа белка, напоминающего белок главного комплекса гистосовместимости класса I (α -FcRn), и имеющего молекулярную массу 15 кДа β 2-микроглобулина (β 2m). FcRn связывается с высокой аффинностью с CH2- и CH3-участком Fc-области IgG. Взаимодействие между IgG и FcRn зависит от значения pH и имеет место при стехиометрическом соотношении 1:2, при этом одна молекула антитела IgG связывается с двумя молекулами FcRn через ее два полипептида Fc-области тяжелой цепи (Huber A.H. и др., J. Mol. Biol. 230, 1993, сс. 1077-1083).

Таким образом, особенности FcRn-связывания/характеристики *in vitro* IgG являются показателем его фармакокинетических свойств *in vivo* в кровотоке.

Во взаимодействии между FcRn и Fc-областью антитела IgG-класса принимают участие различные аминокислотные остатки CH2- и CH3-домена тяжелой цепи. Аминокислотные остатки, взаимодействующие с FcRn, локализованы примерно между EU-положением 243 и EU-положением 261, примерно между EU-положением 275 и EU-положением 293, примерно между EU-положением 302 и EU-положением 319, примерно между EU-положением 336 и EU-положением 348, примерно между EU-положением 367 и EU-положением 393, в EU-положении 408 и примерно между EU-положением 424 и EU-положением 440. Более конкретно, следующие аминокислотные остатки согласно EU-нумерации Кэбота участвуют во взаимодействии между Fc-областью и FcRn: F243, P244, P245 P, K246, P247, K248, D249, T250, L251, M252, I253, S254, R255, T256, P257, E258, V259, T260, C261, F275, N276, W277, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, P291, R292, E293, V302, V303, S304, V305, L306, T307, V308, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, G316, K317, E318, Y319, I336, S337, K338, A339, K340, G341, Q342, P343, R344, E345, P346, Q347, V348, C367, V369, F372, Y373, P374, S375, D376, I377, A378, V379, E380, W381, E382, S383, N384, G385, Q386, P387, E388, N389, Y391, T393, S408, S424, C425, S426, V427, M428, H429, E430, A431, L432, H433, N434, H435, Y436, T437, Q438, K439 и S440.

Опыты с использованием сайт-направленного мутагенеза доказали, что имеющими решающее значение сайтами связывания с FcRn в Fc-области IgG являются гистидин 310, гистидин 435 и изолейцин 253 и в меньшей степени гистидин 433 и тирозин 436 (см., например, Kim J.K. и др., Eur. J. Immunol. 29, 1999, сс. 2819-2825; Raghavan M. и др., Biochem. 34, 1995, сс. 14649-146579; Medesan C. и др., J. Immunol. 158, 1997, сс. 2211-2217).

Методы, предназначенные для повышения IgG-связывания с FcRn, осуществляли, используя мутацию IgG на различных аминокислотных остатках: треонин 250, метионин 252, серин 254, треонин 256, треонин 307, глутаминовая кислота 380, метионин 428, гистидин 433 и аспарагин 434 (см. Куо Т.Т. и др., J. Clin. Immunol. 30, 2010, сс. 777-789).

В некоторых случаях требуются антитела с укороченным временем полужизни в кровотоке. Например, лекарственные средства для интравитреального применения должны иметь продолжительное время полужизни в глазу и короткое время полужизни в кровотоке пациента. Указанные антитела обладают также преимуществом с позиции удлиненной экспозиции области заболевания, например, в глазу.

Известны различные мутации, которые влияют на FcRn-связывание и в результате на время полужизни в кровотоке. Остатки Fc-области, имеющие решающее значение для взаимодействия мышиной Fc-мышинный FcRn, идентифицированы путем сайт-направленного мутагенеза (см., например, Dall'Acqua W.F. и др., J. Immunol. 169, 2002, сс. 5171-5180). Остатки I253, H310, H433, N434 и H435 (EU-нумерация согласно Кэботу) участвуют во взаимодействии (Medesan C. и др., Eur. J. Immunol. 26, 1996, сс. 2533-2536; Firan M. и др., Int. Immunol. 13, 2001, сс. 993-1002; Kim J.K. и др., Eur. J. Immunol. 24, 1994, сс. 542-548). Установлено, что остатки I253, H310 и H435 имеют решающее значение для взаимодействия человеческой Fc-области с мышинным FcRn (Kim J.K. и др., Eur. J. Immunol. 29, 1999, сс. 2819-2825). В опытах, проведенных Dall'Acqua с соавторами, установлено, что остатки M252Y, S254T, T256E улучшают FcRn-связывание путем белок-белкового взаимодействия (Dall'Acqua W.F. и др., J. Biol. Chem. 281, 2006, сс. 23514-23524). Исследования комплекса человеческая Fc-человеческий FcRn продемонстрировали, что остатки I253, S254, H435 и Y436 имеют решающее значение для взаимодействия (Firan M. и др., Int. Immunol. 13, 2001, сс. 993-1002; Shields R.L. и др., J. Biol. Chem. 276, 2001, сс. 6591-6604). У Yeung Y.A. с соавторами (J. Immunol. 182, 2009, сс. 7667-7671) описаны и изучены различные мутанты остатков 248-259 и 301-317, и 376-382 и 424-437. Примеры мутаций и их воздействия на FcRn-связывание представлены ниже в таблице.

Мутация	Воздействие на FcRn-связывание	Время полужизни в кровотоке	Ссылка
H285 H310Q/H433N (мышинный IgG1)	Понижающее (мышинный)	Пониженное (у мышей)	Kim J.K., Scand. J. Immunol. 40, 1994, сс. 457-465
I253A H310A H435A H436A (мышинный IgG1)	Понижающее (мышинный)	Пониженное (у мышей)	Ghetie V. и Ward E.S., Immunol. Today 18, 1997, сс. 592-598
T252L/T254S/T256F T252A/T254S/T256A (мышинный IgG1)	повышающее (мышинный)	Повышенное (у мышей)	Ghetie V. и Ward E.S., Immunol. Today 18, 1997, сс. 592-598
I253A H310A H435A H436A H433A/N434Q (мышинный IgG1)	Понижающее (мышинный)	Пониженное (у мышей)	Medesan C. и др., J. Immunol. 158, 1997, сс. 2211-2217
I253A H310A H435A H435R (человеческий IgG1)	Понижающее H310A: <0,1 относительно связывания с muFcRn (мышинный)	Пониженное (у мышей)	Kim J.K., Eur. J. Immunol. 29, 1999, сс. 2819-2825
H433A (человеческий IgG1)	1,1 относительно связывания с muFcRn, 0,4 относительно связывания с hu FcRn (мышинный)		Kim J.K., Eur. J. Immunol. 29, 1999, сс. 2819-2825
I253A S254A H435A Y436A (человеческий IgG1)	Понижающее <0,1 относительно связывания с huFcRn	Пониженное	Shields R.L., и др., J. Biol. Chem. 276, 2001, сс. 6591-6604

R255A K288A L309A S415A H433A (человеческий IgG1)	Понижающее (человеческий)	Пониженное	Shields R.L. и др., J. Biol. Chem. 276, 2001, сс. 6591- 6604
P238A T256A E272A V305A T307A Q311A D312A K317A D376A A378Q E380A E382A S424A N434A K288A/N434A E380A/N434A T307A/E380A/N434A (человеческий IgG1)	Повышающее (человеческий)	Повышенное	Shields R.L. и др., J. Biol. Chem. 276, 2001, сс. 6591- 6604
H435A (гуманизированный IgG1)	Понижающее <0,1 относительно связывания с huFcRn	Пониженное	Firan M. и др., Int. Immunol. 13, 2001, сс. 993-1002
I253A (нет связывания) M252W M252Y M252Y/T256Q M252F/T256D N434F/Y436H M252Y/S254T/T256E G385A/Q386P/N389S H433K/N434F/Y436H H433R/N434Y/Y436H G385R/Q386T/P387R/N389P M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F/Y436H M252Y/S254T/T256E/G385R /Q386T/P387R/N389P (человеческий IgG1)	Повышающее (мышинный и человеческий)	Пониженное (у мышей)	Dall'Acqua, J. Immunol. 169, 2002, сс. 5171- 5180
M428L T250Q/M428L (человеческий IgG2)	Повышающее (человеческий)	Повышенное (у обезьян)	Hinton P.R. и др., J. Biol. Chem. 279, 2004, сс. 6213- 6216
M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F (человеческий IgG)	Повышающее (человеческий)	Повышенное (у мышей)	Vaccaro C. и др., Nat. Biotechnol. 23, 2005, сс. 1283- 1288
T307A/E380A/N434A (химерный IgG1)	Повышающее	Повышенное у трансгенных мышей	Pop L.M. и др., Int. Immunopharmacol. 5, 2005, сс. 1279- 1290

T250Q E380A M428L N434A K288A/N434A E380A/N434A T307A/E380A/N434A (человеческий IgG1)	Повышающее (человеческий)	Повышенное у трансгенных мышей	Petkova S.B. и др., Int. Immunol 18, 2006, cc. 1759- 1769
I253A (человеческий IgG1)	Понижающее (человеческий)	Пониженное у трансгенных мышей	Petkova S.B. и др., Int. Immunol 18, 2006, cc. 1759- 1769
S239D/A330L/I332E M252Y/S254T/T256E (гуманизированный)	Повышающее (человеческий и циномоглус)	Повышенное у циномоглус	Dall'Acqua W.F. и др., J. Biol. Chem. 281, 2006, cc. 23514-23524
T250Q M428L T250Q/M428L (человеческий IgG1)	Повышающее (человеческий)	Повышенное у макак резус	Hinton P.R. и др., J. Immunol. 176, 2006, cc. 346-356
T250Q/M428L P257I/Q311I (гуманизированный IgG1)	Повышающее (мышинный и циномоглус)	Без изменения у циномоглус, повышенное у мышей	Datta-Mannan A. и др., J. Biol. Chem. 282, 2007, cc. 1709-1717
P257I/Q311I P257I/N434H D376V/N434H (гуманизированный IgG1)	Повышающее при pH 6 (человеческий, циномоглус, мышинный)	Пониженное у мышей P257I/N434H, пониженное у циномоглус	Datta-Mannan A. и др., Drug Metab. Dispos. 35, 2007, cc. 86-94
Аннулируют FcRn-связывание: I253 H310 H433 H435 Снижает FcRn-связывание: Y436 Повышают FcRn-связывание: T250 N252 S254 T256 T307 M428 N434	Повышающее и понижающее	Пониженная способность связывания IgG с FcRn снижает его персистентность в сыворотке; более высокая аффинность взаимодействия FcRn-IgG продолжает время полужизни IgG и сшитых с Fc лекарственных средств в сыворотке	Ropeenian D.C. и Akilesh S., Nat. Rev. Immunol. 7, 2007, cc. 715-725
N434A T307Q/N434A T307Q/N434S V308P/N434A T307Q/E380A/N434A (человеческий IgG1)	Повышающее (обезьян циномоглус)	Повышенная у обезьян циномоглус	Yeung Y.A. и др., Cancer Res. 70, 2010, cc. 3269- 3277
256P 280K 339T 385H 428L 434W/Y/F/A/H (человеческий IgG)	Повышающее при нейтральном pH		WO 2011/ 122011

Было установлено, что одной односторонней мутации в одном полипептиде Fc-области достаточно для существенного ослабления связывания с FcRn. Чем больше мутаций интродуцировали в Fc-область, тем слабее становилось связывание с FcRn. Однако односторонних асимметричных мутаций недостаточно для полного ингибирования FcRn-связывания. Мутации на обеих сторонах необходимы для полного ингибирования FcRn-связывания.

Таким образом, Fc-область представляет собой гетеродимер, и спаривание первого полипептида (тяжелой цепи) Fc-области и второго полипептида (тяжелой цепи) Fc-области с образованием функциональной Fc-области приводит к образованию гетеродимера.

Результаты создания симметричной Fc-области IgG1 для влияния на FcRn-связывание представлены ниже в таблице (сравнительный анализ мутаций и времени удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии).

Мутации, влияющие на эффекторные функции	Мутация 1, влияющая на FcRn-связывание	Мутация 2, влияющая на FcRn-связывание	Мутация 3, влияющая на FcRn-связывание	Время удерживания на FcRn-колонке для аффинной хроматографии [мин]
L234A/L235A/P329G	---	---	---	45,3
L234A/L235A/P329G	I253A	H310A	H435A	2,3
L234A/L235A/P329G	I253A	---	---	2,7
L234A/L235A/P329G	---	H310A	---	2,4
L234A/L235A/P329G	---	---	H435A	2,7
L234A/L235A/P329G	I253A	H310A	---	2,3
L234A/L235A/P329G	I253A	---	H435A	2,3
L234A/L235A/P329G	---	H310A	H435A	2,4
L234A/L235A/P329G	---	H310A	Y436A	2,3
L234A/L235A/P329G	H310A	H433A	Y436A	2,4
L234A/L235A/P329G	---	---	Y436A	41,3

Время удерживания, составляющее менее 3 мин, соответствовало отсутствию связывания, поскольку субстанция находилась в прошедшем потоке ("пустой" пик).

Индивидуальная мутация H310A представляла собой наиболее существенную "молчащую" симметричную мутацию, приводящую к элиминации какого-либо FcRn-связывания.

Симметричная индивидуальная мутация I253A и H435A приводила к относительному сдвигу времени удерживания на 0,3-0,4 мин. Это можно, как правило, рассматривать как не поддающееся выявлению связывание.

Индивидуальная мутация Y436A приводила к поддающейся выявлению силе взаимодействия с содержащей FcRn аффинной колонкой. Не вдаваясь в теорию, эта мутация могла приводить к такому же опосредуемому FcRn времени полужизни, которое можно было отличить от времени полужизни, соответствующего нулевому взаимодействию, что и комбинация мутаций I253A, H310A и H435A (мутация INN-AAA).

Результаты, полученные с использованием симметрично модифицированного антитела к HER2, представлены ниже в таблице (см. в качестве ссылки WO 2006/031370).

Мутация	Время удерживания [мин]
I253H	отсутствие связывания
M252D	отсутствие связывания
S254D	отсутствие связывания
R255D	41,4
M252H	43,6
K288E	45,2
L309H	45,5
E258H	45,6
T256H	46,0
K290H	46,2
D98E	46,2
Дикий тип	46,3
K317H	46,3
Q311H	46,3
E430H	46,4
T307H	47,0
N434H	52,0

Воздействие интродукции асимметричных влияющих на FcRn-связывание мутаций в Fc-область описано на примере биспецифического антитела, собранного с помощью технологии "knobs-into-holes" (см., например, US 7695936, US 2003/0078385; мутации, приводящие к получению "несущей" "впадину" цепи": S354C/T366W, мутации, приводящие к получению "несущей" "выступ" цепи": Y349C/T366S/L368A/Y407V). Воздействие асимметрично интродуцированных мутаций на FcRn-связывание можно легко оценивать с помощью метода FcRn-аффинной хроматографии. Антитела, которые позднее элюируются из FcRn-аффинной колонки, т.е. имеют большее время удерживания на FcRn-аффинной колонке, имеют более продолжительное время полужизни *in vivo*, и наоборот.

Воздействующая на FcRn мутация	Время удерживания на FcRn-аффинной колонке
одна цепь с M252Y/S254T/T256E	56,2 мин
отсутствие	51,8 мин
одна цепь с I253A или H435A	48,8 мин
одна цепь с H310A	48,4 мин
одна цепь с I253A/H435A или I253A/H310A, или H310A/H435A	48,0 мин
одна цепь с H310A/H433A/Y436A	46,7 мин
одна цепь с I253A/H310A/H435A	46,6 мин
одна цепь с L251D/L314D/L432D	46,3 мин
первая цепь с I253A/H310A/H435A, а вторая цепь с H310A или H435A, или I253A/H310A/H435A	отсутствие связывания

Воздействие интродукции асимметричных влияющих на FcRn-связывание мутаций в Fc-область описано также на примере моноспецифического антитела к IGF-1R, собранного с помощью технологии "knobs-into-holes", для того чтобы обеспечить интродукцию асимметричных мутаций (см., например, US 7695936, US 2003/0078385; мутации, приводящие к получению "несущей "впадину" цепи": S354C/T366W, мутации, приводящие к получению "несущей "выступ" цепи": Y349C/T366S/L368A/Y407V). Воздействие асимметрично интродуцированных мутаций на FcRn-связывание можно легко оценивать с помощью метода FcRn-аффинной хроматографии (см. представленную ниже таблицу). Антитела, которые позднее элюируются из FcRn-аффинной колонки, т.е. имеют большее время удерживания на FcRn-аффинной колонке, имеют более продолжительное время полужизни *in vivo*, и наоборот.

Воздействующая на FcRn мутация	Время удерживания на FcRn-аффинной колонке
одна цепь с M252Y/S254T/T256E	57,6 мин
отсутствие	53,0 мин
одна цепь с H310A/H433A/Y436A	42,4 мин
одна цепь с I253A/H310A/H435A	42,0 мин
одна цепь с L251D/L314D/L432D	40,9 мин
первая цепь с I253A/H310A/H435A, а вторая цепь с H310A или H435A, или I253A/H310A/H435A	отсутствие связывания

Асимметричные IHH-AAA- и LLL-DDD-мутации (LLL-DDD-мутация представляет собой комбинацию L251D, L314D и L432D) приводили к более слабому связыванию по сравнению с соответствующим родительским антителом или антителом дикого типа.

Симметричная HHY-AAA-мутация (т.е. комбинация мутаций H310A, H433A и Y436A) приводила к получению Fc-области, которая более не обладала способностью связываться с человеческим FcRn, при этом сохранялась способность связываться с белком А (см. фиг. 11, 12, 13 и 14).

Воздействие интродукции асимметричных влияющих на FcRn-связывание мутаций в Fc-область описано также на примере моноспецифического антитела к IGF-1R (IGF-1R), собранного с помощью технологии "knobs-into-holes" для интродукции асимметричных мутаций (см., например, US 7695936, US 2003/0078385; мутации, приводящие к образованию "впадины": S354C/T366W, мутации, приводящие к образованию "выступа": Y349C/T366S/L368A/Y407V). Воздействие интродуцированных мутаций на связывание с FcRn и связывание с белком А можно легко оценивать с помощью метода FcRn-аффинной хроматографии, метода аффинной хроматографии на белке А и методов на основе SPR (см. приведенную ниже таблицу).

Антитело	Дополнительная мутация в цепи с «выступом»	Дополнительная мутация в цепи с «впадиной»	Мутации, влияющие на FcRn-связывание	FcRn-связывание (SPR)	FcRn-связывание (колонка)	Связывание с белком А (SPR)	Связывание с белком А (колонка)
IGF-1R 0033	нет	нет	нет	да	да	n.d.	да
IGF-1R 0034	нет	I253A H310A H435A	L234A L235A P329G	n.d.	да	n.d.	да
IGF-1R 0035	нет	H310A H433A Y436A	нет	пониженное	пониженное	n.d.	да
IGF-1R 0037	нет	L251D L314D L432D	L234A L235A P329G	n.d.	Да	n.d.	да
IGF-1R 0036	не	M252Y S254T T256E	L234A L235A P329G	n.d.	Да	n.d.	да
IGF-1R 0045	H310A H433A Y436A	H310A H433A Y436A	нет	n.d.	n.d.	n.d.	да

Одним из объектов изобретения является антитело, которое содержит комбинацию мутаций в полипептиде(ах) Fc-области, указанную в настоящем описании.

Fc-область в антителе обуславливает описанные выше характеристики. Антитело может представлять собой любое антитело, обладающее биологической активностью, время полужизни которого *in vivo* требуется понижать или повышать, т.е. время полужизни которого *in vivo* должно быть строго определенным и специально "подогнанным" для его предполагаемого применения.

Б. Сосудистые глазные заболевания.

Сосудистые глазные заболевания включают любые патологические состояния, отличающиеся измененной или нерегулируемой пролиферацией и инвазией новых кровеносных сосудов в структуры тканей глаза, таких как сетчатка или роговица.

В одном из вариантов осуществления изобретения сосудистое глазное заболевание выбирают из группы, включающей влажную возрастную дегенерацию желтого пятна (влажная форма AMD), сухую возрастную дегенерацию желтого пятна (сухая форма AMD), диабетический отек желтого пятна (DME), цистойдный отек желтого пятна (CME), непролиферативную диабетическую ретинопатию (NPDR), пролиферативную диабетическую ретинопатию (PDR), цистойдный отек желтого пятна, васкулит (например, окклюзия центральной вены сетчатки) папиллоэдему (отек диска зрительного нерва), ретинит, конъюнктивит, увеит, хороидит, мультифокальный хороидит, гитоплазмоз глаза, блефарит, "сухой глаз" (болезнь Шегрена) и другие офтальмологические заболевания, при которых глазное заболевание или нарушение ассоциировано с неоваскуляризацией глаза, просачиванием из сосудов и/или отеком сетчатки.

Антитела к IGF-1R, предлагаемые в изобретении, можно применять для предупреждения и лечения влажной формы AMD, сухой формы AMD, CME, DME, NPDR, PDR, блефарита, "сухого глаза" и увеита, также в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения влажной формы AMD, сухой формы AMD, блефарита и "сухого глаза", также в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения CME, DME, NPDR и PDR, также в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения блефарита и "сухого глаза", в частности влажной формы AMD и сухой формы AMD, а также наиболее предпочтительно важной формы AMD.

В некоторых вариантах осуществления изобретения глазное заболевание выбирают из группы, включающей влажную возрастную дегенерацию желтого пятна (влажная форма AMD), отек сетчатки, окклюзию вен сетчатки, ретролентальную фиброплазию и диабетическую ретинопатию.

Другие болезни, ассоциированные с неоваскуляризацией роговицы, включают (но не ограничиваясь только ими) эпидемический кератоконъюнктивит, дефицит витамина А, переносение положенного времени контактных линз, атопический кератит, верхний лимбический кератит, птеригий, сухой кератит, болезнь Шегрена, розовые угри, филектенулоз, сифилис, инфекции, вызываемые микобактериями, липидные дегенерации, химические ожоги, бактериальные язвы, грибковые язвы, инфекции, вызываемые вирусом герпеса простого, инфекции, вызываемые вирусом опоясывающего лишая, протозойные инфекции, саркому Капоши, язву Мурена, краевую дегенерацию Терриена, краевой кератолизис, ревматоидный артрит, системную красную волчанку, полиартерит, травму, саркоидоз Вегенера, склерит, болезнь Стивена-Джонсона, перифигойдную радиальную кератотомию и отторжение трансплантата роговицы.

Заболевания, ассоциированные с ретиальной/хороиальной неоваскуляризацией, включают (но не ограничиваясь только ими) диабетическую ретинопатию, дегенерацию желтого пятна, серповидноклеточную анемию, саркоид, сифилис, псевдоксантому эластическую, болезнь Педжета, окклюзию вен, окклюзию артерий, обструктивное заболевание сонной артерии, хронический увеит/витрит, инфекции, вызываемые микобактериями, болезнь Лайма, системную красную волчанку, ретролентальную фиброплазию, пигментный ретинит, отек сетчатки (включая отек желтого пятна), болезнь Изла, болезнь Бехчета, инфекции, вызывающие ретинит или хороидит, синдром предполагаемого глазного гитоплазмоза, болезнь

Беста, миопию, ямки диска зрительного нерва, болезнь Штаргардта, туберкулез сосудистой оболочки глазного яблока (туберкулезный увеит), хроническое отслоение сетчатки, синдром гипервязкости, токсоплазмоз, осложнения, связанные с травмой и воздействием лазера.

Другие болезни включают (но не ограничиваясь только ими) болезни, ассоциированные с покраснением (неоваскуляризация угла), и болезни, вызываемые аномальной пролиферацией фиброваскулярной или фиброзной ткани, включая все формы пролиферативной витриоретинопатии.

Ретролентальная фиброплазия (FLOP) представляет собой заболевание глаза, которое поражает преждевременно родившихся детей. Вероятно, оно вызывается дезорганизованным ростом кровеносных сосудов сетчатки, что может приводить к рубцеванию и отслоению сетчатки. ROP может быть слабой и может спонтанно устраняться, но может в серьезных случаях приводить к слепоте. В целом, все недоношенные дети имеют риск ROP, а очень низкий вес при рождении является дополнительным фактором риска. Как токсичность кислорода, так и относительно гипоксия могут принимать участие в развитии ROP.

Дегенерация желтого пятна представляет собой медицинское состояние, встречающееся главным образом у престарелых людей, при котором центр внутренней выстилки глаза, известный как желтое пятно (макула) сетчатки, истончается, атрофируется и в некоторых случаях кровоточит. Это может приводить к снижению центрального зрения, что влечет за собой отсутствие возможности видеть мелкие детали, читать или различать лица. Согласно Американской академии офтальмологии в Соединенных Штатах это является причиной потери центрального зрения (слепоты) у людей возрастом старше 50 лет. Хотя некоторые виды дистрофии желтого пятна, которые поражают более молодых индивидуумов, иногда обозначают как дегенерация желтого пятна, понятие, как правило, относится к возрастной дегенерации желтого пятна (AMD или ARMD).

Возрастная дегенерация желтого пятна начинается с характерных отложений желтого цвета, называемых друзами, в макуле (центральная область сетчатки, которая обеспечивает детализированное центральное зрение, называемая ямкой), между пигментным эпителием сетчатки и низлежащей собственно сосудистой оболочкой глаза. Большинство людей с указанными ранними изменениями (которые называют возрастной макулопатией) имеют хорошее зрение. У людей с друзами может развиваться запущенная форма AMD. Риск значительно возрастает, когда друзы становятся крупными и многочисленными и связанными с нарушением в слое пигментированных клеток под желтым пятном. Крупные и мягкие друзы связаны с повышенными отложениями холестерина и могут реагировать на лечение снижающими холестерин средствами или Рео-процедурой.

Запущенная форма AMD, ответственная за глубокую (полную) потерю зрения, имеет две формы: сухую и влажную. Затрагивающая центральную ямку географическая атрофия, сухая форма запущенной AMD, является результатом атрофии слоя пигментного эпителия сетчатки, расположенного под сетчаткой, что приводит к потере зрения в результате потери фоторецепторов (палочек и колбочек) в центральной области глаза. Хотя для этого состояния отсутствует лечение, Национальным институтом глаза и другими организациями продемонстрировано, что витаминные добавки с высокими дозами антиоксидантов, лютеином и зеаксантином замедляют развитие сухой формы дегенерации желтого пятна у некоторых пациентов, улучшая визуальную активность.

Ретинит пигментный (RP) представляет собой группу генетических состояний глаза. При прогрессировании симптомов RP, как правило, ночная слепота предшествует туннельному зрению в течение ряда лет или даже десятилетий. Многие люди с RP не становятся формально слепыми до 40 или 50 лет и сохраняют некоторое зрение в течение всей жизни. У других в результате RP развивается полная слепота, в некоторых случаях даже уже в детстве. Развитие RP в каждом случае является различным. RP является типом наследственной дистрофии сетчатки, т.е. относится к группе наследственных нарушений, при которых аномалии фоторецепторов (палочки и колбочки) или ретинального пигментного эпителия (RPE) сетчатки приводит к прогрессирующей потере зрения. Пораженные индивидуумы сначала страдают нарушенной адаптацией к темноте или никталопией (куриная (ночная) слепота), затем снижением периферического поля зрения (так называемым туннельным зрением) и иногда позднее в процессе развития болезни снижением центрального зрения.

Макулярный отек (отек желтого пятна) имеет место, когда жидкость и белковые отложения собираются на макуле или под макулой глаза, центральной областью желтого цвета сетчатки, вызывая утолщение и набухание. Набухание может искажать центральное зрение человека, поскольку желтое пятно находится вблизи центра сетчатки на задней стенке глазного яблока. Эта область содержит плотно упакованные колбочки, что обеспечивает острое, ясное центральное зрение, позволяющее человеку видеть форму, цвет и детали, которые находятся непосредственно на линии взгляда. Цистовидный (кистозный) макулярный отек является типом макулярного отека, который включает образование кист.

В. Примеры антител к IGF-1R.

Одним из объектов изобретения являются выделенные антитела, которые связываются с IGF-1R.

В некоторых вариантах осуществления изобретения у антитела к IGF-1R элиминирована способностью связываться с FcRn, т.е. оно связывается с человеческим FcRn с аффинностью, сопоставимой или более низкой, чем аффинность антитела, которое имеет мутации I253A/H310A/H435A, или

H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или L251S/L314S/L432S, или их комбинации в Fc-области (нумерации согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R не обладает (остаточной) поддающейся обнаружению способностью связываться с FcRn при определении методом на основе поверхностного плазмонного резонанса.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется величиной K_D , составляющей более 1,7 мкМ при pH 6, т.е. низкой аффинностью.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело имеет такое же или укороченное время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или с их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело имеет время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии, составляющее 3 мин или менее.

В одном из вариантов осуществления изобретения содержащая FcRn аффинная колонка имеет размеры колонки 50 мм × 5 мм, высота слоя составляет 5 см и загрузка составляет 50 мкг антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения уравнивающий буфер содержит 20 mM MES с 150 mM NaCl, значение pH которого доведено до pH 5,5, буфер для элюции содержит 20 mM Трис/HCl с 150 mM NaCl, значение pH которого доведено до pH 8,8, и элюцию осуществляют, используя объем, равный 7,5 объемам колонки (CV), уравнивающего буфера, от 0 до 100% буфера для элюции в объеме, равном 30 CV, а затем 10 CV буфера для элюции.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R не связывается с колонкой с человеческим FcRn из-за одной или нескольких точечных мутаций в CH2- и/или CH3-домене антитела к IGF-1R. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело имеет сопоставимое, т.е. находящееся в пределах $\pm 10\%$, или укороченное время удерживания на содержащей FcRn колонке по сравнению с антителом к IGF-1R с 4 точечными мутациями (HC1: I253A, H310A, H435A; HC2: H310A).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область по меньшей мере с одной из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254FL, H310A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 03, или антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 04.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) или их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в обоих полипептидах Fc-области.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет:

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 02, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03 или SEQ ID NO: 04.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет:

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03.

Они представляют собой последовательности антитела AK18 (<IGF-1R> HUMAB, клон 18), которое описано подробно в WO 2005/005635.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит вариабельный домен модифицированной тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) и соответствующие HVR, происходящие из антитела AK18 (<IGF-1R> HUMAB, клон 18), с улучшенной аффинностью, что описано подробно в WO 2013/041462. Указанные обладающие улучшенной аффинностью антитела к IGF-1R в сочетании с мутациями в Fc-области, представленные в настоящем описании, являются особенно ценными для лечения соответствующих сосудистых глазных заболеваний и воспалительных заболеваний.

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет:

а) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (HVR-L3), или

б) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (HVR-L3), или

в) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77 (HVR-L3), или

г) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 (HVR-L3), или

д) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93 (HVR-L3).

Таким образом, в другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит:

а) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 62, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 63, или

б) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 70, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 71, или

в) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 78, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 79, или

г) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 86, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 87, или

д) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 94, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 95.

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (HVR-L3).

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R имеет тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 (HVR-L3).

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит:

а) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 62, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 63.

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело к IGF-1R содержит

г) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 86, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 87.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело к IGF-1R имеет гетеродимерную Fc-область.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело представляет собой выделенное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 05 или SEQ ID NO: 06.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VL-последовательность SEQ ID NO: 07 или SEQ ID NO: 08.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 05 и VL-последовательность SEQ ID NO: 07.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 06 и VL-последовательность SEQ ID NO: 08.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области, в котором:

I) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутацию Y436A, или

II) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации I253A, H310A и H435A, или

III) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации FB10A, H433A и Y436A, или

IV) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации L251D, L314D и L432D, или

V) первый и второй полипептиды Fc-области содержат мутации L251S, L314S и L432S, или

VI) первый полипептид Fc-области содержит мутацию Y436A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации I253A, H310A и H435A, или

б) мутации H310A, H433A и Y436A, или

в) мутации L251D, L314D и L432D, или

г) мутации L251S, L314S и L432S, или

VII) первый полипептид Fc-области содержит мутации I253A, H310A и H435A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации H310A, H433A и Y436A, или

б) мутации L251D, L314D и L432D, или

в) мутации L251S, L314S и L432S, или

VIII) первый полипептид Fc-области содержит мутации H310A, H433A и Y436A, а второй полипептид Fc-области содержит

а) мутации L251D, L314D и L432D или

б) мутации L251S, L314S и L432S, или

IX) первый полипептид Fc-области содержит мутации L251D, L314D и L432D, а второй полипептид Fc-области содержит мутации L251S, L314S и L432S.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с человеческим FcRn. В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с белком А стафилококков.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело не может связываться специфически с человеческим FcRn. В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело может связываться специфически с белком А стафилококков.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат одну или две мутации, выбранные из I) группы I253A, H310A и H435A, или II) группы H310A, H433A и Y436A, или III) группы L251D, L314D и L432D (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области, и одну или две мутации, выбранные из группы, содержащей мутации L251D, I253A, H310A, L314D, L432D, H433A, H435A и Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в варианте Fc-области (человеческого) IgG-класса.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации в Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), где I) все мутации находятся в первом или втором полипептиде Fc-области или II) одна или две мутации находятся в первом полипептиде Fc-области и одна или две мутации находятся во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в Fc-области.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D в первом, а также во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), или которые содержат мутации I253A/H310A/H435A в первом полипептиде Fc-области и мутации H310A/H433A/Y436A во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения второй полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V (приводящие к образованию "впадины"), а первый полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации S354C и T366W (приводящие к образованию "выступа").

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения полипептиды Fc-области относятся к человеческому IgG1-подклассу. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутации L234A и L235A. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутацию P329G.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения полипептиды Fc-области относятся к человеческому IgG4-подклассу. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутации S228P и L235E. В одном из вариантов осуществления изобретения первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области дополнительно содержат мутацию P329G.

В одном из вариантов осуществления всех объектов изобретения антитело отличается тем, что антитело характеризуется более низкой концентрацией в сыворотке по сравнению с соответствующим биспецифическим антителом без мутаций в полипептидах F-области (через 96 ч после введения в стекловидное тело мышей, которые имеют дефицит мышинового FcRn, но являются гемизиготными трансгенными по человеческому FcRn) (для определения которых применяют анализы, описанные в примере 4), и/или характеризуется сходной (фактор 0,8-1,2) концентрацией в лизатах всего правого глаза по сравнению с соответствующим биспецифическим антителом без мутаций в полипептидах F-области (у мышей, которые имеют дефицит мышинового FcRn, но являются гемизиготными трансгенными по человеческому FcRn, через 96 ч после введения в стекловидное тело правого глаза) (для определения которых применя-

ют анализы, описанные в примере 4), и у него элиминирована способность связываться с человеческим FcRn, и/или оно не связывается с белком А стафилококков (по данным, полученным с помощью SPR), и/или оно сохраняет способность связываться с белком А стафилококков (по данным, полученным с помощью SPR).

В другом объекте изобретения антитело к IGF-1R имеет последовательность варибельного домена тяжелой цепи (VH), идентичную по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 05, или 62, или 86. В некоторых вариантах осуществления изобретения VH-последовательность, идентичная по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции относительно референс-последовательности, но антитело к IGF-1R, содержащее указанную последовательность, сохраняет способность связываться с IGF-1R. В некоторых вариантах осуществления изобретения в целом от 1 до 10 аминокислот заменено, встроено и/или удалено в результате делеции в SEQ ID NO: 05, или 62, или 86. В некоторых вариантах осуществления изобретения замены, инсерции или делеции затрагивают области вне HVR (т.е. FR). Необязательно антитело к IGF-1R содержит VH-последовательность, указанную в SEQ ID NO: 05, или 62, или 86, включая пост-трансляционные модификации этой последовательности.

Другим объектом изобретения является антитело к IGF-1R, где антитело содержит последовательность варибельного домена легкой цепи (VL), идентичную по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 07 или 63, или 87. В некоторых вариантах осуществления изобретения VH-последовательность, идентичная по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции относительно референс-последовательности, но антитело к IGF-1R, содержащее указанную последовательность, сохраняет способность связываться с IGF-1R. В некоторых вариантах осуществления изобретения в целом от 1 до 10 аминокислот заменено, встроено и/или удалено в результате делеции в SEQ ID NO: 07, или 63, или 87. В некоторых вариантах осуществления изобретения замены, инсерции или делеции затрагивают области вне HVR (т.е. FR). Необязательно антитело к IGF-1R содержит VH-последовательность, указанную в SEQ ID NO: 07 или 63, или 87, включая пост-трансляционные модификации этой последовательности.

Другим объектом изобретения является антитело к IGF-1R, где антитело содержит VH, указанную в любом из представленных выше вариантов осуществления изобретения, и VL указанную в любом из представленных выше вариантов осуществления изобретения. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH- и VL-последовательности, указанные в SEQ ID NO: 05 и SEQ ID NO: 07, или в SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63, или в SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87 соответственно, включая пост-трансляционные модификации этих последовательностей.

Следующим объектом изобретения является антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело к IGF-1R, представленное в настоящем описании. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложено антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело к IGF-1R, которое содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 05 и VL-последовательность SEQ ID NO: 07.

В другом варианте осуществления изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело, например, интактное антитело IgG1- или IgG4-подкласса, со связывающей FcRn специфичностью, которое описано выше.

Антитело, предлагаемое в изобретении, получают с помощью методов рекомбинации. Так, одним из объектов настоящего изобретения является нуклеиновая кислота, которая кодирует антитело, предлагаемое в изобретении, а другим объектом изобретения является клетка, которая содержит указанную нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело, предлагаемое в изобретении. Методы рекомбинантного получения широко известны в данной области и заключаются в том, что экспрессируют белок в прокариотических и эукариотических клетках с последующим выделением антитела и, как правило, очисткой до фармацевтически приемлемой чистоты. Для экспрессии антител в вышеуказанных клетках-хозяевах нуклеиновую кислоту, кодирующую соответствующие (модифицированные) легкие и тяжелые цепи, встраивают в экспрессионные плазмиды с помощью стандартных методов. Экспрессию осуществляют в пригодных прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах типа CHO-клеток, NSO-клеток, SP2/0-клеток, HEK293-клеток, COS-клеток, PER.C6-клеток, дрожжей или клеток *E.coli*, и антитело выделяют из клеток (из супернатанта или клеток после лизиса). Общие методы рекомбинантного получения антител хорошо известны в данной области и описаны, например, в обзорных статьях Makrides S.C., *Protein Expr. Purif.* 17, 1999, сс.183-202; Geisse S. и др., *Protein Expr. Purif.* 8, 1996, сс. 271-282; Kaufman R.J., *Mol. Biotechnol.* 16, 2000, сс. 151-160; Werner R.G., *Drug Res.* 48, 1998, сс. 870-880.

Таким образом, одним из объектов изобретения является способ получения антитела, предлагаемого в изобретении, заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых

- а) трансформируют клетку-хозяин плазмидами, содержащими молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют антитело;
- б) культивируют клетку-хозяин в условиях, обеспечивающих синтез антитела; и
- в) выделяют антитело из культуры.

В одном из вариантов осуществления изобретения стадия выделения, указанная в подпункте в), включает применение специфического "захватывающего" реагента для константной области легкой цепи (который, например, является специфическим для константной области легкой к- или λ -цепи, в зависимости от того, применяют легкую к- или λ -цепь в антителе). В одном из вариантов осуществления изобретения специфически "захватывающий" легкую цепь реагент применяют в режиме связывания-и-элюции. Примерами указанных специфических для константной области легкой цепи "захватывающих" реагентов являются, например, KappaSelect™ и LambdaFabSelect™ (фирмы GE Healthcare/BAC), основой которых является очень жесткий матрикс на основе агарозы, который обеспечивает высокие скорости потока и низкое обратное давление при крупномасштабном анализе. Эти материалы содержат лиганд, который связывается с константной областью легкой к- или λ -цепи соответственно (т.е. фрагменты, лишённые константной области легкой цепи, не должны связываться). Таким образом, оба реагента обладают способностью связываться с другими молекулами-мишенями, которые содержат константную область легкой цепи, например IgG, IgA и IgM. Лиганды присоединяют к матриксу через плечо длинного гидрофильного спейсера, что делает их легко доступными для связывания с молекулой-мишенью. Они находятся на одноцепочечном фрагменте антитела, который подвергают скринингу в отношении к- или λ -цепи человеческого Ig.

В одном из вариантов осуществления изобретения стадия выделения, указанная в подпункте в), включает применение специфического "захватывающего" реагента для Fc-области. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный специфически "захватывающий" Fc-область реагент применяют в режиме связывания-и-элюции. Примерами таких специфических "захватывающих" реагентов для Fc-области являются, например, хроматографические материалы для аффинной хроматографии на основе белка A Staphylococcus.

Антитела можно отделять от культуральной среды с помощью общепринятых процедур очистки иммуноглобулинов, таких, например, как аффинная хроматография (на белок А-сефарозе, KappaSelect™, LambdaFabSelect™), хроматография на гидроксипатите, гель-электрофорез или диализ.

ДНК и РНК, кодирующие моноклональные антитела, легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур. В-клетки или клетки гибридомы могут служить в качестве источника таких ДНК и РНК. После выделения ДНК можно встраивать в экспрессионные плазмиды, которыми затем трансфектируют клетки-хозяева, такие как НЕК293-клетки, СНО-клетки или клетки миеломы, которые в противном случае не могут продуцировать белок иммуноглобулина, с получением в результате синтеза рекомбинантных моноклональных антител в клетках-хозяевах.

Некоторые из антител, представленных в настоящем описании, легко выделять/очищать благодаря тому, что они содержат Fc-области, являющиеся по-разному модифицированными, где по меньшей мере одна из модификаций приводит к I) разной аффинности антитела к белку А и II) разной аффинности антитела к человеческому FcRn, и это позволяет выделять антитело из разрушенных клеток, из среды или из смеси антител на основе его аффинности к белку А.

Очистку антител осуществляют для того, чтобы элиминировать клеточные компоненты или другие загрязнители, например другие клеточные нуклеиновые кислоты или белки, с использованием стандартных методик, включая обработку щелочью/ДЧН, CsCl-бэндинг, хроматографию на колонках, электрофорез в агарозном геле и другие методы, хорошо известные в данной области (см. в Current Protocols in Molecular Biology, под ред. Ausubel F. и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). Для очистки белков детально разработаны и нашли широкое применение различные методы, такие как аффинная хроматография с использованием белков микроорганизмов (например, аффинная хроматография на белке А или белке G), ионообменная хроматография (например, катионообменная (карбоксиметильные смолы), анионообменная (аминоэтильные смолы) и хроматография на основе обмена смешанного типа), тиофильная адсорбция (например, с β -меркаптоэтанолом и другими лигандами SH), хроматография гидрофобного взаимодействия или ароматической адсорбции (например, с фенил-сефарозой, азаренофильными смолами или м-аминофенилборной кислотой), металл-хелатная аффинная хроматография (например, с Ni(II)- и Cu(II)-аффинным материалом), гель-фильтрация и электрофоретические методы (такие как гель-электрофорез, капиллярный электрофорез) (Vijayalakshmi M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75, 1998, сс. 93-102).

Следует подчеркнуть, что понятие "содержащий" при применении в контексте настоящего описания включает понятие "состоящий из". Таким образом, во всех объектах и вариантах осуществления изобретения, которые включают понятие "содержащий", аналогично можно использовать понятие "состоящий из".

В другом объекте изобретения антитело к IGF-1R согласно любому из указанных выше вариантов осуществления изобретения может обладать любыми особенностями, индивидуально или в комбинации, описанными ниже в разделах 1-6.

1. Аффинность антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, имеет константу диссоциации (Kd), составляющую ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ (например, 10^{-7} М или менее,

например от 10^{-7} до 10^{-13} М, например от 10^{-8} до 10^{-13} М).

В одном из вариантов осуществления изобретения Kd измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса с помощью устройства BIACORE®.

Например, анализ осуществляли с помощью устройства BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (фирма GE Healthcare Inc., Пискатавей, шт. Нью-Джерси) при 25°C с использованием антигена, иммобилизованного на CM5-чипах с уровнем иммобилизации, соответствующим ~10 единицам ответа (RU). В одном из вариантов осуществления изобретения биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма GE Healthcare Inc.) активировали с помощью гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антиген разводили 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8 до концентрации 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед инъекцией со скоростью потока 5 мкл/мин для достижения уровня иммобилизации, соответствующего примерно 10 единицам ответа (RU) сшитого белка. После инъекции антигена инъецировали 1М этаноламин для блокады непрореагировавших групп. Для кинетических измерений инъецировали двукратные серийные разведения (например, Fab) (от 0,78 до 500 нМ) в ЗФР, дополненном 0,05% полисорбата 20 (TWEEN-20™) в качестве сурфактанта (ЗФРТ), при 25°C со скоростью потока примерно 25 мкл/мин. Скорость реакции ассоциации (k_{on}) и реакции диссоциации (k_{off}) рассчитывали с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (программа оценки BIACORE®, версия 3.2) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия реакции диссоциации (Kd) рассчитывали как соотношение k_{off}/k_{on} (см., например, Chen и др., J. Mol. Biol. 293, 1999, сс. 865-881). Если скорость реакции ассоциации превышала $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ при оценке с помощью описанного выше метода поверхностного плазмонного резонанса, то скорость реакции ассоциации можно определять с помощью метода гашения флуоресценции, который позволяет измерять повышение или снижение интенсивности излучения флуоресценции (длина волны возбуждения 295 нм; длина волны испускания 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C применяемого в концентрации 20 нМ антитела к антигену (Fab-формат) в ЗФР, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, осуществляя измерения с помощью спектрометра, такого как спектрофотометр, снабженный блоком для остановки потока (фирма Aviv Instruments), или спектрофотометр SLM-AMINCO™ серии 8000 (фирма THERmoSpectronic), при перемешивании содержимого кюветы.

2. Химерные и гуманизированные антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, представляет собой химерное антитело. Некоторые химерные антитела описаны, например, в US 4816567; и у Morrison S.L. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 6851-6855. В одном из примеров химерное антитело содержит нечеловеческую вариабельную область (например, вариабельную область из антитела мышей, крыс, хомяков, кроликов или приматов, кроме человека, таких как обезьяны) и человеческую константную область. В другом примере химерное антитело представляет собой антитело "переключенного класса", класс или подкласс которого был изменен относительно родительского антитела. Химерные антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Как правило, нечеловеческое антитело гуманизируют для снижения иммуногенности для людей, сохраняя при этом специфичность и аффинность родительского нечеловеческого антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или несколько вариабельных доменов, в которых HVR, например, CDR (или их участки), происходят из нечеловеческого антитела, а FR (или их участки) происходят из последовательностей человеческого антитела. Гуманизированное антитело не обязательно может содержать по меньшей мере часть человеческой константной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены на соответствующие остатки из нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого происходят остатки HVR), например, для сохранения или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Гуманизированные антитела и методы их создания обобщены, например, у Almagro J.C. и Fransson J., Front. Biosci. 13, 2008, сс. 1619-1633, и описаны также у Riechmann I. и др., Nature 332, 1988, сс. 323-329; Queen C. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, сс. 10029-10033; US 5821337, US 7527791, US 6982321 и US 7087409; Kashmiri S.V. и др., Methods 36, 2005, сс. 25-34 (описание трансплантации определяющих специфичность участков (SDR)); Padlan E.A. Mol. Immunol. 28, 1991, сс. 489-498 описание "метода изменения поверхности" ("нанесения нового покрытия")); Dall'Acqua W.F. и др., Methods 36, 2005, сс. 43-60 (описание "перестановки FR"); Osbourn J. и др., Methods 36, 2005, сс. 61-68 и Klimka A. и др., Br. J. Cancer 83, 2000, сс. 252-260 (описание подхода "направленной селекции" для перестановки FR).

Человеческие каркасные участки, которые можно применять для гуманизации, включают (но не ограничиваясь только ими): каркасные участки, выбранные с использованием методов "наилучшего подбора" (см., например, Sims M.J. и др., J. Immunol. 151, 1993, сс. 2296-2308; каркасные участки, происходящие из консенсусной последовательности конкретной подгруппы вариабельных областей легких и тяжелых цепей человеческих антител (см., например, Carter P. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1992, сс. 4285-4289 и Presta L.G. и др., J. Immunol. 151, 1993, сс. 2623-2632); человеческие зрелые (с соматически-

ми мутациями) каркасные области или каркасные области человеческой зародышевой линии (см., например, Almagro J.C. и Fransson J., *Front. Biosci.* 13, 2008, с. 1619-1633); и каркасные участки, полученные в результате скрининга FR-библиотек (см., например, Basa M. и др., *J. Biol. Chem.* 272, 1997, сс. 10678-10684 и Rosok M.J. и др., *J. Biol. Chem.* 271, 1996, сс. 22611-22618).

3. Человеческие антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой человеческое антитело. Человеческие антитела можно получать, используя различные методики, известные в данной области. Человеческие антитела описаны в целом у van Dijk M.A. и van de Winkel J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 2001, сс. 368-374 и Lonberg N., *Curr. Opin. Immunol.* 20, 2008, сс. 450-459.

Человеческие антитела можно получать путем введения иммуногена трансгенному животному, модифицированному таким образом, чтобы оно продуцировало интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими переменными областями в ответ на контрольное заражение антигеном. Указанные животные, как правило, содержат все или часть локусов человеческого иммуноглобулина вместо эндогенных иммуноглобулиновых локусов, которые либо присутствуют вне хромосом, либо интегрированы произвольно в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей эндогенные иммуноглобулиновые локусы, как правило, инактивированы. Обзор методов получения человеческих антител в трансгенных животных см. у Lonberg N., *Nat. Biotech.* 23, 2005, сс. 1117-1125 (см., например, также в US № 6075181 и US 6150584 описание технологии XENOMOUSE™; в US № 5770429 описание технологии HUMAB®; в US № 7041870 описание технологии K-M MOUSE® и в US № 2007/0061900 описание технологии VelociMouse®). Человеческие переменные области из интактных антител, полученных с помощью указанных животных, можно дополнительно модифицировать, например, путем объединения с другой человеческой константной областью.

Человеческие антитела можно создавать с помощью методов на основе гибридом. Описаны клеточные линии человеческой миеломы и мышинной-человеческой гетеромиеломы, предназначенные для получения человеческих моноклональных антител (см., например, Kozbor D., *J. Immunol.* 133, 1984, сс. 3001-3005; Brodeur B.R. и др., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63 и Boerner P. и др., *J. Immunol.* 147, 1991, сс. 86-95). Человеческие антитела, созданные с использованием технологии на основе человеческих В-клеточных гибридом, описаны также у Li J. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 2006, сс. 3557-3562. Дополнительные методы включают методы, описанные, например, в US 7189826 (описание получения моноклональных человеческих антител типа IgM из клеточных линий гибридом), и у Ni J., *Xiandai Mianyixue* 26, 2006, сс. 265-268 (описание человеческих-человеческих гибридом). Технология человеческих гибридом (технология Trioma) описана также у Vollmers H.P. и Brandlein S., *Histology and Histopathology* 20, 2005, сс. 927-937 и Vollmers H.P. и Brandlein S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27, 2005, сс. 185-191.

Человеческие антитела можно создавать также путем выделения последовательностей переменных доменов Fv-клонов, отобранных из происходящих из человеческих антител фаговых дисплейных библиотек. Указанные последовательности затем можно объединять с требуемым человеческим константным доменом. Технологии селекции человеческих антител из библиотек антител описаны ниже.

4. Антитела, полученные из библиотек.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно выделять путем скрининга комбинаторных библиотек антител с требуемой активностью или видами активности. Например, в данной области известны разнообразные методы для создания фаговых дисплейных библиотек и скрининга указанных библиотек в отношении антител, обладающих требуемыми характеристиками связывания. Указанные методы обобщены, например, у Hoogenboom H.R. и др., *Methods in Molecular Biology* 178, 2001, сс. 1-37, и описаны также, например, у McCafferty J. и др., *Nature* 348, 1990, сс. 552-554; Clackson T. и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628; Marks J.D. и др., *J. Mol. Biol.* 222, 1992, сс. 581-597; Marks J.D. и Bradbury A., *Methods in Molecular Biology* 248, 2003, сс. 161-175; Sidhu S.S. и др., *J. Mol. Biol.* 338, 2004, сс. 299-310; Lee C.V. и др., *J. Mol. Biol.* 340, 2004, сс. 1073-1093; Fellouse F.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2004, сс. 12467-12472 и Lee C.V. и др., *J. Immunol. Methods* 284, 2004, сс. 119-132.

При осуществлении некоторых методов фагового дисплея популяции VH- и VL-генов клонируют по отдельности с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рекомбинируют произвольно в фаговых библиотеках, которые затем подвергают скринингу в отношении антигенсвязывающего фага согласно методу, описанному у Winter G. и др., *Ann. Rev. Immunol.* 12, 1994, сс. 433-455. Фаг, как правило, экспонирует фрагменты антител либо в виде одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), либо в виде Fab-фрагментов. Библиотеки, полученные из иммунизированных источников, включают антитела, обладающие высокой аффинностью к иммуногену, при этом отсутствует необходимость в создании гибридом. Альтернативно этому, можно клонировать необработанную ("наивную") популяцию (например, из организма человека), получая один источник антител к широкому спектру чужих, а также своих антигенов без какой-либо иммунизации, что описано у Griffiths A.D. и др., *EMBO J.* 12, 1993, сс. 725-734. И, нако-

нец, "наивные" библиотеки можно получать также методами синтеза путем клонирования неперегруппированных сегментов V-гена из стволовых клеток и с помощью ПЦР-праймеров, содержащих случайную последовательность, для кодирования гипервариабельных CDR3-участков и для осуществления перегруппировки *in vitro* согласно методу, описанному у Hoogenboom H.R. и Winter G., J. Mol. Biol. 227, 1992, сс. 381-388. Фаговые библиотеки человеческих антител описаны, например, в следующих патентных публикациях: US 5750373 и US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US 2007/0237764, US 2007/0292936 и US 2009/0002360.

Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек человеческих антител, рассматриваются как человеческие антитела или фрагменты человеческих антител.

5. Мультиспецифические антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, представляет собой мультиспецифическое антитело, например биспецифическое антитело. Мультиспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые имеют специфичности, связывающиеся по меньшей мере с двумя различными сайтами. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна из специфичностей связывается с IGF-1R, а вторая с любым другим антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами IGF-1R. Биспецифические антитела можно применять также для локализации цитотоксических агентов в клетках, которые экспрессируют IGF-1R. Биспецифические антитела можно получать в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

Методики создания мультиспецифических антител включают (но не ограничиваясь только ими) рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелых цепей-легких цепей иммуноглобулинов, обладающих различными специфичностями (см. Milstein C. и Cuello A.C., Nature 305, 1983, сс. 537-540, WO 93/08829 и Traunecker A. и др., EMBO J. 10, 1991, сс. 3655-3659), и технологию "knob-in-hole" (см., например, US 5731168). Мультиспецифические антитела можно получать также путем создания регулируемых электростатических воздействий для получения молекул антитела с гетеродимерными Fc (WO 2009/089004); перекрестного связывания двух или большего количества антител или фрагментов (см., например, US 4676980 и Brennan M. и др., Science 229, 1985, сс. 81-83); применения лейциновых молний для получения биспецифических антител (см., например, Kostelny S.A. и др., J. Immunol. 148, 1992, сс. 1547-1553; применения технологии "димерных антител (диабоды)" для создания фрагментов биспецифических антител (см., например, Holliger P. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 6444-6448); и применения димеров одноцепочечных Fv (sFv) (см., например, Gruber M. и др., J. Immunol. 152, 1994, сс. 5368-5374); и получения триспецифических антител согласно методу, описанному, например, у Tutt A. и др., J. Immunol. 147, 1991, сс. 60-69).

Под объем настоящего изобретения подпадают также сконструированные антитела с тремя или большим количеством функциональных антигенсвязывающих сайтов, включая "антитела-осьминоги" (см., например, US 2006/0025576 A1).

Антитело или его фрагмент может включать также "Fab двойного действия" или "DAF" (см., например, US 2008/0069820).

Представленные в настоящем описании антитела или фрагменты включают также мультиспецифические антитела, описанные в WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 и WO 2010/145793.

6. Варианты антител.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к вариантам аминокислотных последовательностей антител, представленных в настоящем описании. Например, может требоваться повышать аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела можно получать путем интродукции соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем синтеза пептидов. Указанные модификации включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для получения конечной конструкции можно использовать любую комбинацию делеций, инсерции и замен при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например способностью связываться с антигеном.

а) Полученные путем замены, инсерции и делеции варианты.

Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются варианты антител, которые имеют одну или несколько аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для замещающего мутагенеза, включают HVR и FR. Консервативные замены представлены ниже в таблице под заголовком "предпочтительные замены". Более общие замены представлены ниже в таблице под заголовком "приведенные в качестве примера замены", и они дополнительно описаны ниже со ссылкой на классы боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены можно интродуцировать в представляющее интерес антитело и продукты подвергать скринингу в отношении требуемой активности, например сохранения/повышения способности к связыванию антигена, пониженной иммуногенности или повышенной ADCC или CDC.

Исходный остаток	Приведенные в качестве примера замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Аминокислоты можно группировать на основе общих свойств боковых цепей следующим образом:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Под неконсервативными заменами подразумевают замену представителя одного из указанных классов на представителя из другого класса.

Один тип полученного в результате замены варианта включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельного участка родительского антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученный(ые) в результате вариант(ы), отобранный(ые) для дополнительного исследования, должен(ы) иметь модификации (например, улучшения) некоторых биологических свойств (например, повышенную аффинность, пониженную иммуногенность) относительно родительского антитела, и/или должен(ы) иметь практически сохраненные определенные биологические свойства родительского антитела. Примером полученного в результате замены варианта является антитело с созревшей аффинностью, которое можно создавать, например, с использованием технологий созревания аффинности на основе фагового дисплея, например, указанных в настоящем описании. В целом, метод состоит в следующем: один или несколько остатков HVR подвергают мутации и варианты антител экспонируют на фаге и подвергают скринингу в отношении конкретной биологической активности (например, аффинности связывания).

Изменения (например, замены) можно осуществлять в HVR, например, для повышения аффинности антитела. Указанные изменения можно делать в "горячих (активных) точках" в HVR, т.е. остатках, кодируемых кодонами, которые с высокой частотой подвергаются мутации в процессе соматического созревания (см., например, Chowdhury P.S., Methods Mol. Biol. 207, 2008, сс. 179-196), и/или остатках, которые контактируют с антигеном, с последующим тестированием варианта VH или VL в отношении аффинности связывания. Созревание аффинности путем создания и повторной селекции из вторичных библиотек описано, например, у Hoogenboom H.R. и др., Methods in Molecular Biology 178, 2002, сс. 1-37. В некоторых вариантах осуществления процесса созревания аффинности интродуцируют разнообразие в гены вариабельной области, выбранные для создания мутации, с помощью любого из широкого разнообразия методов (например, ПЦР пониженной точности, перестановка цепи или сайт-направленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов). Затем создают вторичную библиотеку. Затем библиотеку подвергают скринингу для идентификации любых вариантов антител с требуемой аффинностью. Другой метод, применяемый для интродукции разнообразия, включает подходы, мишенью которых является HVR, при которых несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков одновременно) рандомизируют. Остатки HVR, участвующие в связывании антигена, можно специфически идентифицировать, например используя аланин-сканирующий мутагенез или моделирование. Часто мишенями являются прежде всего CDR-H3 и CDR-L3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения замены, инсерции или делеции могут затрагивать один или несколько HVR, если указанные изменения не снижают существенно способность антитела связываться с антигеном. Например, в HVR могут быть сделаны консервативные изменения (напри-

мер, консервативные замены, указанные в настоящем описании), которые не снижают существенно аффинность связывания. Указанные изменения, например, могут находиться вне принимающих участие в контактировании с антигеном остатков HVR. В некоторых вариантах осуществления изобретения в последовательностях вариантов VH и VL, указанных выше, каждый HVR либо является неизмененным, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Ценным методом идентификации остатков или областей антитела, которые можно подвергать мутагенезу, является так называемый "аланинсканирующий мутагенез", описанный у Cunningham B.C. и Wells J.A., Science 244, 1989, сс. 1081-1085. При осуществлении этого метода остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) идентифицируют и заменяют на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (например, аланин или полиаланин) для решения вопроса о том, будет ли это влиять на взаимодействие антитела с антигеном. Дополнительные замены можно интродуцировать в те положения аминокислот, для которых продемонстрирована функциональная чувствительность к начальным заменам. В альтернативном или дополнительном варианте изучают кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Указанные контактирующие остатки и соседние остатки можно рассматривать в качестве мишеней или исключать из рассмотрения в качестве кандидатов для замены. Варианты можно подвергать скринингу для решения вопроса о том, обладают ли они требуемыми свойствами.

Инсерции в аминокислотные последовательности включают amino- и/или карбоксиконцевые слияния, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или большее количество остатков, а также инсерции одного или нескольких аминокислотных остатков внутрь последовательности. Примером результата осуществления концевых инсерций является антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие инсерционные варианты молекул антител включают слияние N- или C-концов антитела с ферментом (например, для ADEPT (антитело-направляемый фермент пролекарственной терапии) или полипептидом, который удлиняет время полужизни антитела в сыворотке.

б) Варианты гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, изменяют с целью повышения или понижения степени гликозилирования антитела. Добавление или делецию сайтов гликозилирования в антителе можно легко осуществлять путем такого изменения аминокислотной последовательности, которое позволяет создавать или удалять один или несколько сайтов гликозилирования.

Если антитело содержит Fc-область, то можно изменять присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, которые продуцируются клетками млекопитающих, как правило, содержат разветвленный биантенный олигосахарид, который, как правило, присоединен с помощью N-связи к Asn297 CH2-домена Fc-области (см., например, Wright A. и Morrison S.L., TIBTECH 15, 1997, сс. 26-32). Олигосахарид может включать различные углеводы, например маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стебле" биантенной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификации олигосахарида в антителе, предлагаемом в изобретении, можно осуществлять для создания вариантов антитела с определенными улучшенными свойствами.

Одним из вариантов осуществления изобретения являются варианты антитела, имеющие углеводную структуру, в которой снижено содержание фукозы, присоединенной (прямо или косвенно) к Fc-области. Например, содержание фукозы в указанной Fc-области может составлять от 1 до 80%, от 1 до 65%, от 5 до 65% или от 20 до 40%. Содержание фукозы определяют путем расчета среднего содержания фукозы в сахарной цепи на Asn297 относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, комплексных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), которое измеряют с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии согласно методу, описанному, например, в WO 2008/077546. Asn297 обозначает остаток аспарагина, присутствующий примерно в положении 297 в Fc-области (EU-нумерация остатков Fc-области); однако вследствие минорных вариаций последовательности антитела Asn297 может располагаться также примерно на ± 3 аминокислоты в прямом или обратном направлении относительно положения 297, т.е. между положениями 294 и 300. Указанные фукозилированные варианты могут обладать улучшенной ADCC-функцией (см., например, US 2003/0157108; US 2004/0093621). Примерами публикаций, касающихся "дефукозилированных" вариантов антител или вариантов антител "с дефицитом фукозы", являются US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki и др., J. Mol. Biol. 336, 2004, сс. 1239-1249; Yamanaka-Ohnuki и др., Biotech. Bioeng, 87, 2004, с. 614-622). Примерами клеточных линий, которые обладают способностью продуцировать дефукозилированные антитела, являются Lec13 CHO-клетки с дефицитом белкового фукозилирования (Ripka и др., Arch. Biochem. Biophys. 249, 1986, сс. 533-545; US 2003/0157108 и WO 2004/056312, см., прежде всего, пример 11), и клеточные линии с "выключен-

ным" геном, например СНО-клетки с "выключенным" геном α -1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki и др., Biotech. Bioeng., 87, 2004, с. 614-622); Kanda Y. и др., Biotechnol. Bioeng., 94(4), 2006, сс. 680-688; и WO 2003/085107).

Кроме того, описаны варианты антител с бисекционными олигосахаридами, например, в которых биантенный олигосахарид, присоединенный к Fc-области антитела, бисекционнируется с помощью GlcNAc. Указанные варианты антител могут отличаться пониженным фукозилированием и/или повышенной ADCC-функцией. Примеры указанных вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878; US 6602684 и US 2005/0123546. Предложены также варианты антител по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Указанные варианты антител могут обладать повышенной CDC-функцией. Указанные варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087; WO 1998/58964 и WO 1999/22764.

в) Варианты Fc-области.

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения можно интродуцировать в Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, одну или несколько аминокислотных модификаций, создавая тем самым вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность человеческого Fc-области (например, Fc-области человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), включающую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях).

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к варианту антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его перспективным кандидатом для путей применения, для которых является важным время полужизни антитела *in vivo*. Определение FcRn-связывания и клиренса/времени полужизни *in vivo* можно осуществлять также с использованием методов, известных в данной области (см., например, Petkova S.B. и др., Int'l. Immunol. 18(12), 2006, сс. 1759-1769).

Антитела с пониженной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или нескольких следующих остатков Fc-области, таких как 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (см., например, US 6737056). К указанным мутантам Fc относятся мутанты Fc с заменами в двух или большем количестве из следующих аминокислотных положений: 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант "DANA" Fc-области, несущий замену остатков 265 и 297 на аланин (US 7332581).

Описаны некоторые варианты антител с повышенной или пониженной способностью связываться с FcR (см., например, US 6737056; WO 2004/056312 и Shields R.L. и др., J. Biol. Chem, 276, 2001, сс. 6591-6604).

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения вариант антитела содержит Fc-область с одной или несколькими аминокислотными заменами, которые повышают ADCC, например, замены в положениях 298, 333, и/или 334 Fc-области (EU-нумерация остатков).

В некоторых вариантах осуществления изобретения в Fc-области осуществляют изменения, которые приводят к измененной (т.е. либо повышенной, либо пониженной) способности связывать Clq и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). что описано, например, в US 6194551, WO 99/51642 и у Idusogie и др., J. Immunol. 164, 2000, сс. 4178-4184.

Дополнительные примеры, касающиеся других вариантов Fc-области, описаны также у Duncan A.R. и Winter, G., Nature 322, 1988, сс. 738-740; US 5648260; US 5624821 и WO 94/29351.

г) Варианты антител, сконструированные с помощью цистеина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения может оказаться желательным создавать антитела, сконструированные с помощью цистеина, например "тиоМАТ", в которых один или несколько остатков в антителе заменены на остатки цистеина. В конкретных вариантах осуществления изобретения замененные остатки находятся в доступных сайтах антитела. Путем замены этих остатков на цистеин реакционноспособные тиольные группы помещаются в доступные сайты антитела и могут использоваться для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты, представляющие собой лекарственное средство, или фрагменты, представляющие собой линкер, связанный с лекарственным средством, с созданием иммуноконъюгата, указанного ниже в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения любой(ые) один или нескольких следующих остатков может(гут) быть заменен(ы) на цистеин: V205 (нумерация по Кэботу) легкой цепи; A118 (EU-нумерация) тяжелой цепи и S400 (EU-нумерация) Fc-области тяжелой цепи. Антитела, сконструированные с помощью цистеина, можно создавать согласно методу, например, описанному в US 7521541.

д) Производные антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, можно дополнительно модифицировать таким образом, чтобы оно содержало дополнительные небелковые фрагменты, известные в данной области и легко доступные. Фрагменты, пригодные для дериватизации антитела, включают (но не ограничиваясь только ими) водорастворимые полимеры. Примерами водорастворимых полимеров являются (но не ограничиваясь только ими) полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового

ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран- или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси.

Полиэтиленгликольпропиональдегид может иметь преимущество при производстве благодаря его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антители, может варьироваться и, если присоединено более одного полимера, то они могут представлять собой одинаковые или различные молекулы. В целом, количество и/или тип полимеров, применяемых для дериватизации, можно определять с учетом таких особенностей (но не ограничиваясь только ими), как конкретные свойства или функции антителя, подлежащие усовершенствованию, предполагается ли применение производного антителя в терапии в определенных условиях, и т.д.

Другим вариантом осуществления изобретения являются конъюгаты антителя и небелкового фрагмента, которые можно избирательно нагревать, воздействуя на него излучением. В одном из вариантов осуществления изобретения небелковый фрагмент представляет собой углеродную нанотрубку (Kam и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 2005, сс. 11600-11605). Излучение может иметь любую длину волны и включает (но не ограничиваясь только ими) длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают небелковый фрагмент до температуры, при которой уничтожаются клетки, ближайшие к конъюгату: антители-небелковый фрагмент.

е) Гетеродимеризация.

Известно несколько подходов к модификациям в СНЗ для усиления гетеродимеризации, которые описаны, например, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291. Как правило, при использовании любого из таких подходов первый СНЗ-домен и второй СНЗ-домен, оба, создают комплементарным путем так, чтобы каждый СНЗ-домен (или содержащая его тяжелая цепь) более не обладал способностью к гомодимеризации сам с собой, но обладал усиленной способностью к гетеродимеризации с комплементарно сконструированным другим СНЗ-доменом (так, чтобы имела место гетеродимеризация первого и второго СНЗ-доменов и не образовывались гомодимеры между двумя первыми или двумя вторыми СНЗ-доменами). Указанные различные подходы улучшения гетеродимеризации тяжелых цепей рассматриваются в качестве различных альтернатив в сочетании с модификациями тяжелой-легкой цепи (замена/обмен VH и VL в одном связывающем плече и интродукция замен заряженных аминокислот на противоположные заряды в поверхности раздела CH1/CL) в мультиспецифических антителях, предлагаемых в изобретении, которые снижают ошибочное спаривание легких цепей побочных продуктов типа белка Бенс-Джонса.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения (в случае мультиспецифического антителя, содержащего СНЗ-домены в тяжелых цепях) СНЗ-домены указанного мультиспецифического антителя, предлагаемого в изобретении, можно изменять с использованием технологии "knob-into-holes", которая описана подробно в нескольких примерах, например, в WO 96/027011, у Ridgway J.B. и др., Protein Eng. 9, 1996, сс. 617-621 и у Merchant A.M. и др., Nat. Biotechnol. 16, 1998, сс. 677-681; WO 98/050431. При осуществлении этого метода поверхности взаимодействия двух СНЗ-доменов изменяют с целью повышения гетеродимеризации обеих тяжелых цепей, содержащих два указанных СНЗ-домена. Каждый из двух СНЗ-доменов (двух тяжелых цепей) может представлять собой "выступ", а другой представлять собой "впадину". Интродукция дисульфидного мостика дополнительно стабилизирует гетеродимеры (Merchant A.M. и др., Nature Biotech 16, 1998, сс. 677-681; Atwell S. и др., J. Mol. Biol. 270, 1997, сс. 26-35) и повышает выход.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения указанное мультиспецифическое антители (которое содержит СНЗ-домен в каждой тяжелой цепи) дополнительно отличается тем, что первый СНЗ-домен первой тяжелой цепи антителя, указанного в подпункте а), и второй СНЗ-домен второй тяжелой цепи антителя, указанного в подпункте б), каждый вступает в контакт на поверхности раздела, которая представляет собой исходную поверхность раздела между СНЗ-доменами антителя, где указанную поверхность изменяют так, чтобы способствовать образованию мультиспецифического антителя, где изменение отличается тем, что:

I) СНЗ-домен одной тяжелой цепи изменяют так, что в исходной поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая контактирует с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи в мультиспецифическом антители, аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, создавая тем самым выпуклость на поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость в поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, и

II) СНЗ-домен другой тяжелой цепи изменяют так, что в исходной поверхности раздела второго СНЗ-домена, которая контактирует с исходной поверхностью раздела первого СНЗ-домена в мультиспецифическом антители, аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, создавая тем самым полость в поверхности раздела второго СНЗ-домена, в ко-

тору может помещаться выпуклость на поверхности раздела первого СНЗ-домена.

Предпочтительно аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, выбирают из группы, состоящей из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W).

Предпочтительно аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, выбирают из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T), валина (V).

В одном из объектов изобретения оба СНЗ-домена дополнительно изменяют путем интродукции аминокислоты цистеина (C) в соответствующие положения каждого СНЗ-домена так, чтобы мог образовываться дисульфидный мостик между обоими СНЗ-доменами.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения указанное мультиспецифическое антитело содержит аминокислотную мутацию Т366W в первом СНЗ-домене "цепи с выступами" и аминокислотные мутации Т366S, L368A, Y407V во втором СНЗ-домене "цепи с впадиной". Можно применять также дополнительный межцепочечный дисульфидный мостик между СНЗ-доменами (Merchant A.M. и др., Nature Biotech, 16, 1998, сс. 677-681), например, путем интродукции аминокислотной мутации Y349C в СНЗ-домен "цепи с впадиной" и аминокислотной мутации E356C или аминокислотной мутации S354C в СНЗ-домен "цепи с выступами".

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения указанное мультиспецифическое антитело (которое содержит СНЗ-домен в каждой тяжелой цепи) содержит аминокислотные мутации S354C, Т366W в одном из двух СНЗ-доменов и аминокислотные мутации Y349C, Т366S, L368A, Y407V во втором из двух СНЗ-доменов (дополнительная аминокислотная мутация Y349C в одном из СНЗ-доменов и дополнительная аминокислотная мутация E356C или S354C в другом СНЗ-домене приводит к образованию межцепочечного дисульфидного мостика) (нумерация во всех случаях согласно Кэботу).

Другие методы СНЗ-модификаций, направленные на усиление гетеродимеризации, рассматриваются в качестве альтернативных вариантов осуществления изобретения, и они описаны, например, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в EP 1870459 A1. Этот подход базируется на интродукции зарядов/мутаций заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположным зарядом в конкретные аминокислотные положения на поверхности раздела СНЗ/СНЗ-доменов между двумя тяжелыми цепями. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения в указанном мультиспецифическом антителе присутствуют аминокислотные мутации R409D; K370E в первом СНЗ-домене (мультиспецифического антитела) и аминокислотные мутации D399K; E357K во втором СНЗ-домене мультиспецифического антитела (нумерации согласно Кэботу).

В другом варианте осуществления изобретения указанное мультиспецифическое антитело содержит аминокислотную мутацию Т366W в СНЗ-домене "цепи с выступами" и аминокислотные мутации Т366S, L368A, Y407V в СНЗ-домене "цепи с впадиной" и дополнительно аминокислотные мутации R409D; K370E в СНЗ-домене "цепи с выступами" и аминокислотные мутации D399K; E357K в СНЗ-домене "цепи с впадиной".

В другом варианте осуществления изобретения указанное мультиспецифическое антитело содержит аминокислотные мутации S354C, Т366W в одном из двух СНЗ-доменов и аминокислотные мутации Y349C, Т366S, L368A, Y407V во втором из двух СНЗ-доменов, или указанное мультиспецифическое антитело содержит аминокислотные мутации Y349C, Т366W в одном из двух СНЗ-доменов и аминокислотные мутации S354C, Т366S, L368A, Y407V во втором из двух СНЗ-доменов и дополнительно аминокислотные мутации R409D; K370E в СНЗ-домене "цепи с выступами" и аминокислотные мутации D399K; E357K в СНЗ-домене "цепи с впадиной".

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2013/157953. В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию Т366K, а полипептид второго СНЗ-домена содержит аминокислотную мутацию L351D. В следующем варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит дополнительную аминокислотную мутацию L351K. В другом варианте осуществления изобретения второй СНЗ-домен содержит дополнительную аминокислотную мутацию, выбранную из Y349E, Y349D и L368E (предпочтительно L368E).

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2012/058768. В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации L351Y, Y407A. а второй СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации Т366A, K409F. В следующем варианте осуществления изобретения второй СНЗ-домен содержит дополнительную аминокислотную мутацию в положении T411, D399, S400, F405, N390 или K392, например, выбранные из а) T411N, T411R, T411Q, T411D, T411E или T411W, б) D399R, D399W, D399Y или D399K, в) S400E, S400D, S400R или S400K F405I, F405M, F405T, F405S, F405V или F405W, N390R, N390K или N390D, K392V, K392M, K392R, K392L, K392F или K392E. В следующем варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотные мута-

ции L351Y, Y407A, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации T366V, K409F. В другом варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию Y407A, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации T366A, K409F. В следующем варианте осуществления изобретения второй СНЗ-домен содержит дополнительно аминокислотные мутации K392E, T411E, D399R и S400R.

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2011/143545, например, с использованием аминокислотной модификации в положении, выбранном из группы, состоящей из 368 и 409.

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2011/090762, в котором применяют описанную выше технологию "knobs-into-holes". В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию T366W, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию Y407A. В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию T366Y, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию Y407T.

В одном из вариантов осуществления изобретения мультиспецифическое антитело имеет IgG2-изотип и в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2010/129304.

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2009/089004. В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную замену K392 или N392 на отрицательно заряженную аминокислоту (например, глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), предпочтительно K392D или N392D), а второй СНЗ-домен содержит аминокислотную замену D399, E356, D356 или E357 на положительно заряженную аминокислоту (например, лизин (K) или аргинин (R), предпочтительно D399K, E356K, D356K или E357K и более предпочтительно D399K и E356K. В другом варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит также аминокислотную замену K409 или R409 на отрицательно заряженную аминокислоту (например, глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), предпочтительно K409D или R409D). В следующем варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен в дополнительном или альтернативном варианте содержит аминокислотную замену K439 и/или K370 на отрицательно заряженную аминокислоту (например, глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D)).

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2007/147901. В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации K253E, D282K и K322D, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации D239K, E240K и K292D. В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2007/110205.

Д. Методы рекомбинации и композиции.

Антитела можно получать, используя методы рекомбинации и композиции, например, описанные в US 4816567. Одним из вариантов осуществления изобретения является выделенная(ые) нуклеиновая(ые) кислота(ы), кодирующая(ие) антитело(а), представленное(ые) в настоящем описании. Указанная нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкие и/или тяжелые цепи антитела). Следующим вариантом осуществления изобретения является(ются) одна или несколько плазмид (например, экспрессионных плазмид), которые содержат указанную нуклеиновую кислоту. Еще одним вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, которая содержит указанную нуклеиновую кислоту. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин содержит (например, в результате трансформации указанными плазмидами): (1) плазмиду, содержащую нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первую плазмиду, содержащую нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и вторую плазмиду, содержащую нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, например клетку яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидную клетку (например, Y0-, NS0-, Sp20-клетку). Одним из вариантов осуществления изобретения является способ получения антитела к IGF-1R, указанного в настоящем описании, заключающийся в том, что культивируют клетку-хозяин, содержащую нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело, описанное выше, в условиях, пригодных для экспрессии антитела, и необязательно выделяют антитело из клетки-хозяина (или среды для культивирования клетки-хозяина).

Для рекомбинантного получения антитела к IGF-1R нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, описанное выше, выделяют и встраивают в одну или несколько плазмид для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Указанную нуклеиновую кислоту легко можно выделять и секвенировать с использованием общепринятых процедур (например, путем использования оли-

гонуклеотидных зондов, которые обладают способностью специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Приемлемые клетки-хозяева для клонирования или экспрессии кодирующих антитело плазмид включают прокариотические или эукариотические клетки, представленные в настоящем описании. Например, антитела можно получать в бактериях, в частности, когда не требуется гликозилирование и связанная с Fc эффекторная функция. Сведения об экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях см., например, в US 5648237, US 5789199 и US 5840523 (см. также у Charlton K.A. в: *Methods in Molecular Biology*, под ред. Lo B.K.C, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 245-254, описание экспрессии фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело можно выделять из пасты бактериальных клеток в виде растворимой фракции и можно дополнительно очищать.

Помимо прокариотических организмов в качестве хозяев, пригодных для клонирования или экспрессии плазмид, которые кодируют антитела, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были "гуманизированы", что позволяет получать антитело с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215).

Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии гликозилированного антитела, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные штаммы бакуловирусов и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, US 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью OB40 (COS-7); линия клеток почки эмбриона человека (HEK293-клетки или клетки линии 293, описанные, например, у Graham и др., *J. Gen. Virol.*, 36, 1977, сс. 59-74); клетки почки детеныша хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (TM4-клетки, описанные, например, у Mather, *Biol. Reprod.*, 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383, 1982, сс. 44-68); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая DHFR-CHO-клетки (Urlaub и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1980, сс. 4216-4220); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства антител, см., например, у Yazaki и Wu, в *Methods in Molecular Biology* под ред. B.K.C. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268.

Анализы.

Антитела к IGF-1R, представленные в настоящем описании, можно идентифицировать, подвергать скринингу или характеризовать их физические/химические свойства и/или виды биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области.

В одном из объектов изобретения тестируют антигенсвязывающую активность антитела, предлагаемого в изобретении, например, с помощью известных методов, таких как ELISA, Вестерн-блоттинг и т.д.

Одним из объектов изобретения являются анализы, предназначенные для идентификации антител к IGF-1R, которые обладают биологической активностью.

Е. Комбинированная терапия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к IGF-1R или фармацевтическую композицию, предлагаемое/предлагаемую в изобретении, применяют индивидуально (без дополнительного терапевтического средства) для лечения одного или нескольких сосудистых глазных заболеваний, указанных в настоящем описании.

Согласно другим вариантам осуществления изобретения антитело к IGF-1R или фармацевтическую композицию, предлагаемое/предлагаемую в изобретении, применяют в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами или методами для лечения одного или нескольких сосудистых глазных заболеваний, указанных в настоящем описании.

В других вариантах осуществления изобретения антитело к IGF-1R или фармацевтическую композицию, предлагаемое/предлагаемую в изобретении приготавливают в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами и применяют для лечения одного или нескольких сосудистых глазных заболеваний, указанных в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления изобретения комбинированные терапии, представленные в настоящем описании, предусматривают введение антитела к IGF-1R или фармацевтической композиции, предлагаемого/предлагаемой в изобретении, последовательно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами для лечения одного или нескольких сосудистых глазных заболеваний, указанных в настоящем описании.

Дополнительные терапевтические средства включают (но не ограничиваясь только ими) триптофан-тРНК-синтазу (TrpRS), EyeOO1 (пэгилированный анти-VEGF аптамер), скваламин, RETAANE™ (анекортава ацетат в виде депо-суспензии; фирма Alcon, Inc.), пролекарство комбретастина A4 (CA4P), MACUGEN™, MIFEPREX™ (мифепристон-gu486), субтенон, триамцинолона ацетонид, интравитреальный кристаллический триамцинолона ацетонид, приномастат (AG3340-синтетический ингибитор матричных металлопротеиназ, фирма Pfizer), флуцинолона ацетонид (включая внутриглазной имплантат флуцинолона, фирма Bausch & Lomb/Control Delivery Systems), ингибиторы VEGFR (фирма Sugen), VEGF-Trap (фирма Regeneron/Aventis), ингибиторы тирозинкиназного рецептора VEGF, такие как 4-(4-бром-2-фторанилино)-6-метокси-7-(1-метилпиперидин-4-илметокси)хиназолин (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиллиндол-5-илокси)-6-метокси-7-(3-пирролидин-1-илпропокси)хиназолин (AZD2171), ваталаниб (PTK787) и SU1 1248 (сунитиниб), линомид и ингибиторы функции интегрин β -3, и ангиостатин.

Другие фармацевтические терапии, которые можно применять в сочетании с антителом к IGF-1R или фармацевтической композицией, предлагаемым/предлагаемой в изобретении, включают (но не ограничиваясь только ими), VISUDYNE™, применяемый вместе с нетермическим лазером, PKC 412, эндовизион (фирма NeuroSearch A/S), нейротрофические факторы, включая в качестве примера глиальный нейротрофический фактор и цилиарный нейротрофический фактор, диатазем, дорзоламид, фототроп (Phototrop), 9-цис-ретиаль, глазные лекарственные средства (включая эхо-терапию (Echo Therapy), включая фосфолина йодид или эхо-тиофат, или ингибиторы угольной ангидразы, AE-941 (фирма AEterna Laboratories, Inc.), Sirna-027 (фирма Sirna Therapeutics, Inc.), пераптаниб (фирма NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), нейротрофины (включая только в качестве примера NT-4/5, фирма Genentech), Cand5 (фирма Acuity Pharmaceuticals), INS-37217 (фирма Inspire Pharmaceuticals), антагонисты интегрин (включая препараты фирм Jerini AG и Abbott Laboratories), EG-3306 (фирма Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (фирма BioDiem Ltd.), талидомид (применяемый, например, фирмой EntreMed, Inc.), кардиотрофин-1 (фирма Genentech), 2-метоксиэстрадиол (фирма Allergan/Oculex), DL-8234 (фирма Toray Industries), NTC-200 (фирма Neurotech), тетраиомолибдат (Мичиганский Университет (University of Michigan)), LYN-002 (фирма Lynkeus Biotech), соединение из микроводорослей (фирма Aquasearch/Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (фирма Celltech Group pic), ATX-S10 (Hamamatsu Photonics), TGF- β 2 (фирма Genzyme/Celtrix), ингибиторы тирозинкиназ (фирмы Allergan, SUGEN, Pfizer), NX-278-L (фирма NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (фирма OPTIS France SA), нейропротекторы ганглиев клеток сетчатки (фирма Cogent Neurosciences), N-нигропиразольные производные (фирма Texas A&M University System), KP-102 (фирма Krenitsky Pharmaceuticals), циклоспорин А, "ограниченную транслокацию сетчатки", фотодинамическую терапию (PDT) (включая (только в качестве примера) рецепторнаправленную PDT, фирма Bristol-Myers Squibb, Co.; порфирин натрия для инъекции совместно с PDT; вертепорфин, фирма QLT Inc.; растапорфин, применяемый совместно с PDT, фирма Mlravent Medical Technologies; талапорфин натрия, применяемый совместно с PDT, фирма Nippon Petroleum; мотексафин лютеция, фирма Pharmacyclics, Inc.), антисмысловые олигонуклеотиды (включая только в качестве примера продукты, протестированные фирмой Novagali Pharma SA и ISIS-13650, фирма Isis Pharmaceuticals), лазерную фотокоагуляцию, обработку друз лазером, хирургию макулярных разрывов сетчатки, хирургическую транслокацию макулы, имплантируемые миниатюрные телескопы, ангиографию Phi-движения (известную также как микролазерная терапия или ангиография фидерных сосудов), бомбардировку протонным пучком, микростимулирующую терапию, хирургию по поводу отслоения сетчатки и операцию на стекловидном теле, операцию вдавливания сферы, операцию в субмакулярной области, транспупиллярную термотерапию, терапию фотосистемы I, применение РНК-интерференции (РНКi), экстракорпоральный реоферез (известный также как мембранная дифференциальная фильтрация и реотерапия), имплантацию микрочипов, терапию стволовыми клетками, генную заместительную терапию, генную терапию на основе рибозимов (включая генную терапию с использованием элемента ответа на гипоксию, фирмы Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; генная терапия PDEF, фирма GenVec), трансплантацию фоторецепторных/ретиальных клеток (включая трансплантируемые эпителиальные клетки сетчатки, фирма Diaclin, Inc.; трансплантат клеток сетчатки, фирма Cell Genesys, Inc.) и акупунктуру.

Любое антиангиогенное средство можно применять в сочетании с антителом к IGF-1R или фармацевтической композиций, предлагаемым/предлагаемой в изобретении, включая (но не ограничиваясь только ими) указанные у Carmeliet и Jain, Nature 407, 2000, сс. 249-257. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиангиогенное средства представляет собой другой антагонист VEGF или антагонист рецептора VEGF, такой как варианты VEGF, фрагменты растворимого рецептора VEGF, аптамеры, обладающие способностью блокировать VEGF или VEGFR, нейтрализующие антитела к VEGFR, низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ VEGFR и любые их комбинации, и они включают анти-VEGF

аптамеры (например, пегаптаниб), растворимые рекомбинантные рецепторы-ловушки (например, VEGF Trap). В некоторых вариантах осуществления изобретения антиангиогенное средство включает кортикостероиды, ангиостатические стероиды, анекортава ацетат, ангиостатин, эндостатин, малые интерферирующие РНК, снижающие экспрессию VEGFR или лиганда VEGF, средства пост-VEGFR-блокады на основе ингибиторов тирозинкиназ, ингибиторы MMP, IGFBP3, блокаторы SDF-1, PEDF, γ -секретазу, δ -подобный лиганд 4, антагонисты интегрина, блокатор HIF-1- α , блокатор протеинкиназы CK2 и ингибитор хоминга стволовой клетки (т.е. клетки-предшественника эндотелиальных клеток) к области неоваскуляризации с использованием эндотелиального кадгерина (CD-144) и антител к стромальному фактору (SDF)-I. Можно применять также низкомолекулярные ингибиторы RTK, мишенью которых являются VEGF-рецепторы, включая PTK787. Можно применять также агенты, обладающие активностью в отношении неоваскуляризации, которые не обязательно представляют собой анти-VEGF-соединения, и они включают противовоспалительные лекарственные средства, ингибиторы m-Tor, рапамицин, эверолимус, темсилолимус, циклоспон, анти-TNF-агенты, агенты, мишенью которых является комплемент, и нестероидные противовоспалительные средства. Можно применять также агенты, обладающие нейрозащитным действием, и которые могут потенциально снижать развитие сухой формы дегенерации желтого пятна, например, класс лекарственных средств, называемых "нейростероидами". Они включают такие лекарственные средства, как дегидроэпиандростерон (DHEA) (товарные знаки: Prastera® и Fidelin®), дегидроэпиандростерона сульфат и прегненолона сульфат. Любое предназначенное для лечения AMD (возрастная дегенерация желтого пятна) терапевтическое средство можно применять в сочетании с биспецифическим антителом или фармацевтической композицией, предлагаемым/предлагаемой в изобретении, включая (но не ограничиваясь только ими) вертепорфин в сочетании с PDT, пегаптаниб натрия, цинк или антиоксидант(ы), индивидуально или в любой комбинации.

Ж. Фармацевтические композиции.

Фармацевтические композиции антитела к IGF-1R, представленного в настоящем описании, получают путем смешения указанного антитела, имеющего необходимую степень чистоты, с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences, под ред. A. Osol, 1980) в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, они включают (но не ограничиваясь только ими) буферы, такие как фосфатный, цитратный, ацетатный буферы, а также буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и метакрезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (содержащие менее приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; содержащие металл комплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). В контексте настоящего описания фармацевтически приемлемые носители включают также диспергирующие агенты интерстициальных лекарственных средств, такие как растворимые активные в нейтральной среде гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как gHuPH20 (HYLENEX®, фирма Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и методы их применения, в том числе gHuPH20, описаны в US 2005/0260186 и 2006/0104968. Согласно одному из объектов изобретения sHASEGP объединяют с одним или несколькими дополнительными гликозаминогликанами, такими как хондроитиназы.

Примеры лиофилизированных композиций антител описаны в US 6267958. Водные композиции антител включают композиции, описанные в US 6171586 и WO 2006/044908, последние композиции включают гистидин-ацетатный буфер.

Композиция, представленная в настоящем описании, может содержать также более одного действующего вещества, если это необходимо для конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно соединения с дополнительными видами активности, которые не оказывают вредного воздействия друг на друга. Указанные действующие вещества должны присутствовать в комбинации в количествах, эффективных в отношении поставленной задачи.

Действующие вещества можно включать также в микрокапсулы, например, полученные с помощью методов коацервации или межфазной полимеризации, например в гидроксипропилметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы введения лекарственного средства (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, под ред. A. Osol, 1980.

Можно приготавливать препараты с замедленным высвобождением. Приемлемыми примерами препаратов с замедленным высвобождением являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, включающие антитело, такие матрицы представляют собой изделия определенной формы, например пленки или микрокапсулы.

Композиции, предназначенные для применения *in vivo*, как правило, должны быть стерильными. Это легко можно осуществлять путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

3. Терапевтические способы и композиции.

Любое из антител к IGF-1R, представленных в настоящем описании, можно применять в терапевтических способах.

В одном из объектов изобретения антитело к IGF-1R, представленное в настоящем описании, предназначено для применения в качестве лекарственного средства. В других объектах изобретения антитело к IGF-1R, представленное в настоящем описании, предназначено для применения для лечения сосудистых глазных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к IGF-1R, представленное в настоящем описании, предназначено для применения в способе лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к IGF-1R, представленное в настоящем описании, предназначено для применения в способе лечения индивидуума, имеющего сосудистое глазное заболевание, заключающемся в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве антитело к: IGF-1R, представленное в настоящем описании. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ дополнительно заключается в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, указанное выше в разделе Г. В дополнительных вариантах осуществления изобретения антитело к IGF-1R, представленное в настоящем описании, предназначено для ингибирования IGF-1R в глазу. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к IGF-1R, представленное в настоящем описании, предназначено для применения в способе ингибирования ангиогенеза у индивидуума, заключающемся в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве антитело к IGF-1R для ингибирования передачи сигнала IGF-1R. "Индивидуум" согласно любому из указанных выше вариантов осуществления изобретения предпочтительно представляет собой человека.

Следующим объектом изобретения является применение антитела к IGF-1R, представленного в настоящем описании, для производства или приготовления лекарственного средства. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для лечения глазного сосудистого заболевания. В другом варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения глазного сосудистого заболевания, заключающемся в том, что вводят индивидууму, имеющему глазное сосудистое заболевание, в эффективном количестве лекарственное средство. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ дополнительно заключается в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, описанное выше. В другом варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для ингибирования ангиогенеза. В другом варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе ингибирования ангиогенеза у индивидуума, заключающемся в том, что вводят индивидууму лекарственное средство в количестве, эффективном для ингибирования опосредуемой IGF-1R передачи сигнала. "Индивидуум" согласно любому из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой человека.

Следующим объектом изобретения является способ лечения сосудистого глазного заболевания. В одном из вариантов осуществления изобретения способ заключается в том, что вводят индивидууму, имеющему указанное сосудистое глазное заболевание, в эффективном количестве антитело к IGF-1R. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, указанное ниже. "Индивидуум" согласно любому из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой человека.

Другим объектом изобретения является способ ингибирования ангиогенеза в глазу у индивидуума. В одном из вариантов осуществления изобретения способ заключается в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве антитело к IGF-1R, указанное в настоящем описании, для ингибирования опосредуемой IGF-1R передачи сигнала. В одном из вариантов осуществления изобретения "индивидуум" представляет собой человека.

Следующим объектом изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие любое из антител к IGF-1R, представленных в настоящем описании, например, предназначенные для применения в любом из указанных выше терапевтических способов. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любое из антител к IGF-1R, представленных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любое из антител к IGF-1R, представленных в настоящем описании, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, описанное ниже.

Антитела, представленные в настоящем описании, можно применять для лечения либо индивидуально, либо в сочетании с другими средствами. Например, антитело, представленное в настоящем описа-

нии, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством.

Антитело, представленное в настоящем описании (и любое дополнительное лекарственное средство), можно вводить любыми приемлемыми путями, включая парентеральный, внутрилегочный и интраназальный и при необходимости применять для местной обработки, осуществляя введение в повреждение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование можно осуществлять любым приемлемым путем, например путем инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, в зависимости, в том числе, от того, является ли лечение кратковременным или хроническим. Можно применять различные схемы дозирования, включая (но не ограничиваясь только ими) однократное введение или несколько введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульсирующую инфузию.

Антитела, представленные в настоящем описании, можно включать в состав композиций, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное заболевание, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину заболевания, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам. Антитело можно, но это не является обязательным, включать в композицию в сочетании с одним или несколькими другими агентами, которые в настоящее время применяют для предупреждения рассматриваемого заболевания. Эффективное количество указанных других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в композиции, типа нарушения или лечения и других указанных выше факторов. Их, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием таких же путей введения, которые указаны в настоящем описании, или в количестве, составляющем от 1 до 99% от дозы, указанной в настоящем описании, или в любой дозе и с помощью любого пути, который является пригодным по данным эмпирической/клинической оценки.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза антитела, представленного в настоящем описании (при его применении индивидуально или в сочетании с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами), должна зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, серьезности и течения болезни, применяют ли антитело для профилактических или терапевтических целей, предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело, а также предписания лечащего врача. Антитело можно вводить пациенту однократно или в виде серий обработок. В зависимости от типа и серьезности заболевания примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,5-10 мг/кг) антитела может представлять собой начальную возможную дозу для введения пациенту, например, с помощью одной или нескольких отдельных обработок или с помощью непрерывной инфузии. Одним из примеров типичных суточных доз может являться доза, составляющая от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от указанных выше факторов. При использовании повторных введений в течение нескольких дней или более длительного периода времени, в зависимости от состояния, лечение, как правило, следует продолжать до достижения подавления симптомов заболевания. Одним из примеров доз антитела является доза, составляющая от примерно 0,05 до примерно 10 мг/кг. Так, пациенту можно вводить одну или несколько следующих доз: примерно 0,5, 2,0, 4,0 или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Указанные дозы можно вводить мелко, например каждую неделю или каждые три недели (например, так, чтобы пациент получал от примерно двух до примерно двадцати, например примерно шесть доз антитела). Можно применять начальную повышенную ударную дозу с последующим введением одной или нескольких более низких доз. С помощью общепринятых методов и анализов можно легко осуществлять мониторинг действия указанной терапии.

III. Изделия.

Другим объектом изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностирования указанных выше нарушений. Изделие представляет собой контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку, которые размещены на контейнере или вложены в него. Приемлемыми контейнерами являются, например банки, пузырьки, шприцы, пакеты для внутривенного раствора и т.д. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностирования состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для IV-раствора или пузырек, снабженный пробкой, которую можно прокалывать с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет антитело, указанное в настоящем описании. На этикетке или листовке-вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может включать (а) первый контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит антитело, представленное в настоящем описании; и (б) второй контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительное цитотоксическое или иное терапевтическое средство. Согласно этому варианту осуществления изобретения изделие может содержать листовку-вкладыш в упаковку, которая содержит информацию о том, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. В альтернативном или дополнительном варианте изделие может дополнительно включать второй (или третий) контейнер с

фармацевтически приемлемым буфером, таким как бактериостатическая вода для инъекций (БСВИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может включать другие продукты, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в частности другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Как должно быть очевидно, любое из указанных выше изделий может включать иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, вместо или в дополнение к антителу к IGF-1R.

IV. Конкретные варианты осуществления изобретения.

1. Антитело к IGF-1R, которое специфически связывается с человеческим IGF-1R и у которого элиминирована способность связываться с FcRn.

2. Антитело по варианту осуществления изобретения 1, где связывание антитела с человеческим FcRn характеризуется аффинностью, сопоставимой или более низкой, чем аффинность антитела, которое имеет мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации в Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

3. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1, 2, где антитело к IGF-1R не обладает (остаточной) поддающейся обнаружению способностью связываться с FcRn при определении методом на основе поверхностного плазмонного резонанса.

4. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-3, где связывание антитела с человеческим FcRn характеризуется величиной K_D , составляющей более 1,7 мкМ при pH 6.

5. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-4, где антитело имеет такое же или укороченное время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/F1435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или с их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

6. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-5, где антитело имеет время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии, составляющее 3 мин или менее.

7. Антитело по варианту осуществления изобретения 6, где содержащая FcRn аффинная колонка имеет размеры колонки 50 мм × 5 мм, высота слоя составляет 5 см и загрузка составляет 50 мкг антитела.

8. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 6, 7, где уравнивающий буфер для содержащей FcRn колонки для аффинной хроматографии содержит 20 mM MES с 150 mM NaCl, значение pH которого доведено до pH 5,5, буфер для элюции содержит 20 mM Трис/HCl с 150 mM NaCl, значение pH которого доведено до pH 8,8, и элюцию осуществляют, используя объем, равный 7,5 объемам колонки (CV), уравнивающего буфера, от 0 до 100% буфера для элюции в объеме, равном 30 CV, а затем 10 CV буфера для элюции.

9. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-8, где антитело к IGF-1R не связывается с колонкой с человеческим FcRn из-за одной или нескольких точечных мутаций в CH2- и/или CH3-домене антитела к IGF-1R.

10. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-9, где связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область по меньшей мере с одной из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, M434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

11. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-10, где связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое содержит Fc-область с мутациями I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинациями (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

12. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-11, где связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется примерно такой же или меньшей аффинностью по сравнению с антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 01 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 03, или антителом, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 96 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 04.

13. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-12, где антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) или их комбинацию.

14. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-13, где антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота)

во втором полипептиде Fc-области.

15. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-14, где антитело к IGF-1R имеет, по меньшей мере, мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

16. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-15, где антитело к IGF-1R имеет, по меньшей мере, мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в обоих полипептидах Fc-области.

17. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-16, где антитело к IGF-1R имеет:

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03.

18. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-16, где вариант антитела к IGF-1R имеет:

а) тяжелую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 02, и

б) легкую цепь антитела, которая содержит в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 04.

19. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-16, где антитело к IGF-1R имеет:

а) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (HVR-L3), или

б) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (HVR-L3), или

в) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77 (HVR-L3), или

г) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 (HVR-L3), или

д) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93 (HVR-L3), или

е) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 02, и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотные остатки

24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 04, или

ж) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01, и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03.

20. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-19, где антитело к IGF-1R содержит:

а) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 62, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 63, или

б) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 70, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 71, или

в) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 78, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 79, или

г) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 86, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 87, или

д) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 94, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 95, или

е) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 05, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 07, или

ж) переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 06, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 08.

21. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-20, где антитело к IGF-1R имеет тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (HVR-L3).

22. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-20, где антитело к IGF-1R имеет тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 (HVR-L3).

23. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-20, где антитело к IGF-1R содержит переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 62, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 63.

24. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-20, где антитело к IGF-1R содержит переменный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 86, и переменный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 87.

25. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-24, где антитело к IGF-1R имеет Fc-область, содержащую первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области.

26. Антитело по варианту осуществления изобретения 25, где антитело к IGF-1R имеет гетеродимерную Fc-область.

27. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-26, в котором

1) первый полипептид Fc-области, выбранный из группы, содержащей

полипептид Fc-области человеческого IgG1,

полипептид Fc-области человеческого IgG2,

полипептид Fc-области человеческого IgG3,

полипептид Fc-области человеческого IgG4,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями Y349C, T366S, L368A, Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями S354C, T366S, L368A, Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A, S354C, T366S, L368A, Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутацией P329G,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A, P329G,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V,
 полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями P329G, S354C, T366S, L368A, Y407V,
 полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A, P329G, Y349C, T366S,
 L368A, Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A, P329G, S354C, T366S,
 L368A, Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E, P329G,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями Y349C, T366S, L368A, Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S354C, T366S, L368A, Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E, Y349C, T366S, L368A,
 Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E, S354C, T366S, L368A,
 Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутацией P329G,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями P329G, S354C, T366S, L368A, Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E, P329G, Y349C, T366S,
 L368A, Y407V,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E, P329G, S354C, T366S,
 L368A, Y407V,

человеческий IgG1, IgG2 или IgG4 с мутацией K392D и

человеческий IgG3 с мутацией N392D,

II) второй полипептид Fc-области, выбранный из группы, содержащей

полипептид Fc-области человеческого IgG1,

полипептид Fc-области человеческого IgG2,

полипептид Fc-области человеческого IgG3,

полипептид Fc-области человеческого IgG4,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями S354C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями Y349C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A, S354C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A, Y349C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутацией P329G,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A, P329G,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями P329G, S354C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями P329G, Y349C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A, P329G, S354C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A, P329G, Y349C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E, P329G,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S354C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями Y349C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E, S354C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E, Y349C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутацией P329G,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями P329G, S354C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями P329G, Y349C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E, P329G, S354C, T366W,

полипептид Fc-области человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E, P329G, Y349C, T366W,

человеческий IgG1 с мутациями D399K, D356K и/или E357K и

человеческий IgG2, IgG3 или IgG4 с мутациями D399K, E356K и/или E357K.

28. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-27, в котором

I) первый полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность, выбранную из груп-
 пы, содержащей SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 36 и 38, и

II) второй полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность, выбранную из груп-
 пы, содержащей SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 35, 37 и 39.

29. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-27, в котором

I) полипептид Fc-области представляет собой полипептид Fc-области человеческого IgG1 и второй
 полипептид Fc-области представляет собой полипептид Fc-области человеческого IgG1, или

II) первый полипептид Fc-области представляет собой полипептид Fc-области человеческого IgG1 с
 мутациями L234A, L235A и второй полипептид Fc-области представляет собой полипептид Fc-области

последовательность SEQ ID NO: 06 и VL-последовательность SEQ ID NO: 08.

39. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-34, где антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 62 и VL-последовательность SEQ ID NO: 63.

40. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-34, где антитело содержит VH-последовательность SEQ ID NO: 86 и VL-последовательность SEQ ID NO: 87.

41. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-40, где антитело содержит Fc-область, содержащую первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области, в котором

I) первый и второй полипептиды Fc-области дополнительно содержат мутацию Y436A, или

II) первый и второй полипептиды Fc-области дополнительно содержат мутации I253A, H310A и H435A, или

III) первый и второй полипептиды Fc-области дополнительно содержат мутации H310A, H433A и Y436A, или

IV) первый и второй полипептиды Fc-области дополнительно содержат мутации L251D, L314D и L432D, или

V) первый полипептид Fc-области дополнительно содержит мутацию Y436A, а второй полипептид Fc-области дополнительно содержит

а) мутации I253A, H310A и H435A, или

б) мутации H310A, H433A и Y436A, или

в) мутации L251D, L314D и L432D, или

VI) первый полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации I253A, H310A и H435A, а второй полипептид Fc-области дополнительно содержит

а) мутации H310A, H433A и Y436A или

б) мутации L251D, L314D и L432D, или

VII) первый полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации H310A, H433A и Y436A, а второй полипептид Fc-области дополнительно содержит

а) мутации L251D, L314D и L432D.

42. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-40, где антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат одну или две мутации, выбранные из I) группы I253A, H310A и H435A, или II) группы H310A, H433A и Y436A, или III) группы L251D, L314D и L432D (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области, и одну или две мутации, выбранные из группы, содержащей мутации L251D, I253A, H310A, L314D, L432D, H433A, H435A и Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации в первом и втором полипептидах Fc-области в сочетании приводят к тому, что мутации I) I253A, H310A и H435A или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в варианте Fc-области.

43. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-40, где антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые оба содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации в Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), где либо все мутации находятся в первом или втором полипептиде Fc-области, либо одна или две мутации находятся в первом полипептиде Fc-области и одна или две мутации находятся во втором полипептиде Fc-области, в результате в сочетании все мутации в первом и втором полипептидах Fc-области в сочетании приводят к тому, что мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в Fc-области.

44. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-40, где антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D в первом, а также во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), или которые содержат комбинации мутаций I253A/H310A/H435A в первом полипептиде Fc-области и комбинацию мутаций H310A/H433A/Y436A во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

45. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-44, где I) антитело не может связываться специфически с человеческим FcRn и может связываться специфически с белком А стафилококков, или II) антитело не может связываться специфически с человеческим FcRn и не может связываться специфически с белком А стафилококков.

46. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-45, где антитело характеризуется более низкой концентрацией в сыворотке по сравнению с соответствующим биспецифическим антителом без мутаций в полипептидах Fc-области (через 96 ч после введения в стекловидное тело у мы-

шей, которые имеют дефицит мышинового FcRn, но являются гемизиготными трансгенными по человеческому FcRn) (для определения которых применяют анализы, описанные в примере 4), и/или характеризуется сходной (фактор 0,8-1,2) концентрацией в лизатах всего правого глаза по сравнению с соответствующим биспецифическим антителом, без мутаций в полипептидах Fc-области (у мышей, которые имеют дефицит мышинового FcRn, но являются гемизиготными трансгенными по человеческому FcRn, через 96 ч после введения в стекловидное тело правого глаза) (для определения которых применяют анализы, описанные в примере 4), и у него элиминирована способность связываться с человеческим FcRn, и/или оно не связывается с белком А стафилококков (по данным, полученным с помощью SPR), и/или оно сохраняет способность связываться с белком А стафилококков (по данным, полученным с помощью SPR).

47. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-46, где антитело содержит последовательность варибельного домена тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 05, или 62, или 86.

48. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-47, где антитело содержит последовательность варибельного домена легкой цепи (VL), которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 07, или 63, или 87.

49. Применение антитела к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48 для ингибирования IGF-1R в глазу.

50. Применение антитела к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48 для лечения сосудистых глазных заболеваний.

51. Способ лечения пациента, который страдает сосудистыми глазными заболеваниями, заключающийся в том, что вводят антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48 пациенту, который нуждается в таком лечении.

52. Антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48, предназначенное для интравитреального введения.

53. Антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48, предназначенное для лечения сосудистых глазных заболеваний.

54. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48 и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

55. Антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48, предназначенное для применения в качестве лекарственного средства.

56. Антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48, предназначенное для применения для лечения сосудистых глазных заболеваний.

57. Антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48, предназначенное для применения в способе лечения

58. Антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48, предназначенное для применения в способе лечения индивидуума, который имеет сосудистое глазное заболевание, заключающемся в том, что вводят индивидуума в эффективном количестве антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48.

59. Антитело по варианту осуществления изобретения 58, где способ дополнительно заключается в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

60. Антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48, предназначенное для применения для ингибирования IGF-1R в глазу.

61. Антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48, предназначенное для применения в способе ингибирования ангиогенеза в глазу индивидуума, заключающемся в том, что вводят индивидуума в эффективном количестве антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48 для ингибирования передачи сигналов IGF-1R.

62. Применение антитела к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48 для приготовления лекарственного средства.

63. Применение по варианту осуществления изобретения 62, в котором лекарственное средство предназначено для лечения сосудистого глазного заболевания.

64. Применение по одному из вариантов осуществления изобретения 62-63, в котором лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения сосудистого глазного заболевания, заключающемся в том, что вводят индивидууму, имеющему сосудистое глазное заболевание, в эффективном количестве лекарственное средство.

65. Применение по варианту осуществления изобретения 64, в котором способ дополнительно заключается в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

66. Применение по одному из вариантов осуществления изобретения 62-65, в котором лекарственное средство предназначено для ингибирования ангиогенеза.

67. Применение по одному из вариантов осуществления изобретения 62-66, в котором лекарственное средство предназначено для применения в способе ингибирования ангиогенеза у индивидуума, заключающемся в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве лекарственное средство для ингибирования опосредуемой IGF-1R передачи сигналов.

68. Способ лечения сосудистого глазного заболевания.

69. Способ по варианту осуществления изобретения 68, где способ заключается в том, что вводят индивидууму, который имеет сосудистое глазное заболевание, в эффективном количестве антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48.

70. Способ по варианту осуществления изобретения 69, где способ заключается также в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

71. Способ ингибирования ангиогенеза в глазу индивидуума.

72. Способ по варианту осуществления изобретения 71, где способ заключается в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48 для ингибирования опосредуемой IGF-1R передачи сигналов.

73. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48.

74. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления изобретения 73, где композиция предназначена для применения в любом из вариантов осуществления изобретения 49-72.

75. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48 и фармацевтически приемлемый носитель.

76. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к IGF-1R по одному из вариантов осуществления изобретения 1-48 и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

77. Антитело, или применение, или способ по одному из вариантов осуществления изобретения 49-72, где введение представляет собой интравитреальное введение.

V. Примеры.

Ниже представлены примеры способов и композиций, предлагаемых в изобретении. Следует понимать, что с учетом представленного выше общего описания для практического воплощения можно использовать различные другие варианты осуществления изобретения.

Антитела и соответствующие им последовательности

Описание	Последовательности
<IGF-1R> IgG1 wt	SEQ ID NO: 42 SEQ ID NO: 43
<IGF-1R> IgG1 с I253A, H310A, H435A	SEQ ID NO: 42 SEQ ID NO: 44
<IGF-1R> IgG1 с M252Y, S254T, T256E	SEQ ID NO: 42 SEQ ID NO: 45
<IgF-1R> IgG1 wt, KiH	SEQ ID NO: 42 SEQ ID NO: 46 SEQ ID NO: 47
<IgF-1R> IgG1 «выступ» wt, «впадина» I253A, H310A, H435A	SEQ ID NO: 42 SEQ ID NO: 48 SEQ ID NO: 49
<IGF-1R> IgG1 «выступ» wt, «впадина» H310A, H433A, Y436A	SEQ ID NO: 42 SEQ ID NO: 50 SEQ ID NO: 51
<IGF-1R> IgG1 «выступ» wt, «впадина» M252Y, S254T, T256E	SEQ ID NO: 42 SEQ ID NO: 52 SEQ ID NO: 53
<IGF-1R> IgG1 «выступ» wt, «впадина» L251D, L314D, L432D	SEQ ID NO: 42 SEQ ID NO: 54 SEQ ID NO: 55
<IGF-1R> IgG1 with H310A, H433A, Y436A	SEQ ID NO: 42 SEQ ID NO: 96

Методы.

Масс-спектрометрия с ионизацией электроспреем (ESI-MS).

Аликвоты белка (50 мкг) дегликозилировали, добавляя 0,5 мкл N-гликаназы плюс (фирма Roche) и натрий-фосфатный буфер (0,1M, pH 7,1), с получением конечного объема образца 115 мкл. Смесь инкубировали при 37°C в течение 18 ч. Затем для восстановления и денатурации добавляли 60 мкл 0,5M ТСЕР (фирма Pierce) в 4M гуанидине × HCl (фирма Pierce) и 50 мкл 8M гуанидина × HCl. Смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Образцы обессоливали с помощью гель-фильтрации (сефароза G-25, изократический режим, 40% ацетонитрила с 2% муравьиной кислоты). ESI-масс-спектры (+ve) определя-

ли с помощью устройства Q-TOF (maXis, фирма Bruker), снабженным источником нано-ESI (TriVersa NanoMate, фирма Advion). Устанавливали следующие параметры для МС: перенос: ионная воронка RF, 400 Vpp; ISCID энергия, 0 эВ; мультипольный анализатор с радиочастотным генератором (RF), 400 Vpp; квадрупольный анализатор: энергия ионов, 4,0 эВ; нижний предел массы, 600 m/z; источник: сухой газ, 8 л/мин; температура сухого газа, 160°C; ячейка столкновения: энергия столкновения, 10 эВ; столкновение RF: 2000 Vpp; ячейка охлаждения ионов: ячейка охлаждения ионов RF, 300 Vpp; время переноса: 120 мкс; выдерживание перед импульсом 10 мкс; диапазон сканирования m/z от 600 до 2000. Оценку данных осуществляли с помощью созданной в лаборатории заявителей программы (MassAnalyzer).

Анализ (связывания) FcRn методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Особенности связывания с FcRn антител дикого типа и мутантных оценивали с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием устройства BIAcore T100 (фирма BIAcore AB, Уппсала, Швеция). Эта система создана для изучения молекулярных взаимодействий. Она позволяет осуществлять непрерывный мониторинг в реальном времени связывания лиганд/аналит и таким образом определять кинетические параметры в различных режимах анализа. SPR-технология основывается на измерении показателя преломления близи поверхности покрытого золотом биосенсорного чипа. Изменения коэффициента преломления свидетельствуют об изменениях массы на поверхности, вызываемых взаимодействием иммобилизованного лиганда с аналитом, инъецируемым в растворе. Масса возрастает, если молекулы связываются с иммобилизованными лигандами на поверхности, и наоборот масса снижается в случае диссоциации аналита. При осуществлении предлагаемого в изобретении анализа FcRn-рецептор иммобилизовали на биосенсорном CM5-чипе BIAcore (фирма GE Healthcare Bioscience, Уппсала, Швеция) путем аминного сочетания до достижения уровня иммобилизации, соответствующего 400 единицам ответа (RU). Анализ осуществляли при комнатной температуре с использованием 3ФР, 0,05% Tween-20™ pH 6,0 (фирма GE Healthcare Bioscience) в качестве подвижного буфера и буфера для разведения. Образцы антитела (200 нМ) инъецировали со скоростью потока 50 мкл/мин при комнатной температуре. Продолжительность ассоциации составляла 180 с, фаза диссоциации занимала 360 с. Для достижения регенерации поверхности чипа применяли кратковременную инъекцию HBS-P, pH 8,0. Оценку полученных с помощью SPR данных осуществляли путем сравнения высоты сигнала биологического ответа через 180 с после инъекции и через 300 с после инъекции. Соответствующие параметры представляли собой уровень RU_{max} (180 с после инъекции) и позднюю стабильность (300 с после окончания инъекции).

Анализ (связывания) белка А методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Анализ основан на спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса. Белок А иммобилизовали на поверхности SPR-биосенсора. При инъекции образца в проточные ячейки SPR-спектрометра он образует комплекс с иммобилизованным белком А, что приводит к увеличению массы на поверхности сенсорного чипа и, как следствие, к более высокому уровню ответа (в виде 1 единицы RU, определение при 1 пг/мм²). Затем сенсорный чип регенерировали с помощью растворения комплекса образец-белок А. Полученные ответы затем анализировали в отношении высоты сигнала в виде единиц ответа (RU) и характеристик диссоциации.

Белок А (20 мкг/мл) сшивали с CM5-чипом (фирма GE Healthcare) с уровнем связывания, соответствовавшим примерно 3500 единицам ответа (RU), при pH 4,0, используя набор для аминного сочетания фирмы GE Healthcare.

Буфер для образца и для системы представлял собой HBS-P+ (0,01M HEPES, 0,15M NaCl, 0,005% сурфактанта P20, стерилизованный фильтрацией, pH 7,4). Температуру проточной ячейки устанавливали на 25°C и температуру ячейки для образца на 12°C. Систему примировали подвижным буфером. Затем инъецировали 5 нМ растворы конструкций образцов в течение 120 с со скоростью потока 30 мкл/мин, с последующей 300-секундной фазой диссоциации. Затем поверхность сенсорного чипа регенерировали с помощью двух инъекций продолжительностью 30 с глицин × HCl, pH 1,5 со скоростью потока 30 мкл/мин. Каждый образец оценивали в трех повторностях.

Пример 1. Приготовление содержащей FcRn колонки для аффинной хроматографии.

Экспрессия FcRn в HEK293-клетках.

FcRn временно экспрессировали после трансфекции HEK293-клеток двумя плазмидами, содержащими кодирующую последовательность FcRn и β -2-микроглобина. Трансфектированные клетки культивировали во встряхиваемых колбах при 36,5°C, 120 об/мин (амплитуда шейкера 5 см) при 80%-ной влажности в атмосфере, содержащей 7% CO₂. Клетки разводили каждые 2-3 дня до плотности 3-4×10⁵ клеток/мл.

Для кратковременной экспрессии в 14-литровом биореакторе из нержавеющей стали сначала изменяли объем культуры 8 л при 36,5°C, pH 7,0±0,2, pO₂ 35% (барботирование N₂ и воздухом, общая скорость газа 200 мл·мин⁻¹) и скорость перемешивания 100-400 об/мин. Когда плотность клеток достигала 20×10⁶ клеток/мл, 10 мг плазмидной ДНК (эквивалентные количества обеих плазмид) разводили в 400 мл среды Opti-MEM (фирма Invitrogen). К указанной смеси добавляли 20 мл реагента 293fectin (фирма Invitrogen), после чего инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и затем переносили в

ферментер. Начиная со следующего дня, к клеткам в непрерывном режиме добавляли питательные вещества: подпитывающий раствор добавляли со скоростью 500 мл в день и при необходимости добавляли глюкозу для поддержания ее концентрации на уровне, превышающем 2 г/л. Супернатант собирали через 7 дней после трансфекции, используя центрифугу с качающейся головкой с 1-литровыми стаканами: 4000 об/мин в течение 90 мин. Супернатант (13 л) осветляли с помощью фильтра Sartobran P (0,45 мкм + 0,2 мкм, фирма Sartorius) и из него очищали комплекс FcRn- β_2 -микроглобулин.

Биотинилирование неонатального Fc-рецептора.

Растворимый внеклеточный домен FcRn с His-Avi-меткой, который совместно экспресировали с β_2 -микроглобулином в НЕК293-клетках, биотинилировали после очистки следующим образом.

Примерно 1,2-12 мг FcRn/ β_2 -микроглобулина в 5 мл 20 mM натрий-цитратного буфера, pH 5,5, содержащего 150 mM KCl, 250 мкл 3ФР и 1 таблетку полного ингибитора протеаз (фирма Roche Diagnostics GmbH, Мангейм, Германия), биотинилировали с помощью набора для биотинилирования фирмы Avidity согласно инструкциям производителя (набор Bulk BIRA). Реакцию биотинилирования осуществляли при комнатной температуре в течение ночи. Модифицированный белок подвергали диализу в противотоке 20 mM натрий-фосфатного буфера, содержащего 150 mM NaCl, pH 7,5 при 4°C в течение ночи для удаления избытка биотина.

Сшивание со стрептавидиновой сефарозой.

Добавляли 1 г стрептавидиновой сефарозы (фирма GE Healthcare) к биотинилированному и подвергнутому диализу рецептору (от 1,2 до 12 мг FcRn/ β_2 -микроглобулина, для стандартного аналитического внесения отбирали 3 мг) и инкубировали в течение 2 ч при встряхивании. Дериватизированной рецептором сефарозой заполняли 1-миллилитровую ХК-колонку (фирма GE Healthcare).

Пример 2. Хроматография с использованием содержащей FcRn аффинной колонки.

Дериватизированной рецептором сефарозой заполняли 1-миллилитровую ХК-колонку (фирма GE Healthcare) и затем содержащую FcRn колонку уравнивали с помощью буфера на основе 20 mM 2-(N-морфолин)этансульфоновой кислоты (MES), содержащего 150 mM NaCl, pH 5.

Условия:

размеры колонки: 50 мм × 5 мм,

высота слоя: 5 см,

загрузка: 50 мкг образца,

буфер для уравнивания: 20 mM MES с 150 mM NaCl, регулирующий значение pH до 5,5,

буфер для элюции: 20 mM Трис/HCl с 150 mM NaCl, регулирующий значение pH до 8,8,

элюция: 7,5 CV буфера для уравнивания, в 30 CV до 100% буфера для элюции, 10 CV буфера для элюции.

Значение pH образцов антитела, содержащих 50-100 мкг белка, доводили до pH 5,5 и вносили на FcRn-колонку, используя хроматографическую систему ÄKTA explorer 10 XT или Dionex Summit (фирма Dionex, Идштайн, Германия). Затем колонку, высота слоя которой составляла 5 см, промывали, используя объем, равный 5-10 объемам колонки, буфера для уравнивания, содержащего 20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 5,5. Связанные на основе аффинности антитела элюировали, используя градиент pH до 20 mM Трис/HCl, 150 mM NaCl, pH 8,8, в объеме, равном 30 объемам колонки. Для полной элюции модифицированных антител значение pH повышали, используя градиент вплоть до pH 8,8. Эксперименты осуществляли при комнатной температуре. Профиль элюции получали путем постоянного измерения абсорбции при 280 нм. Время, требуемое для достижения пика аналита, X, в детекторе после инъекции образца обозначали как время удерживания.

Пример 3. Экспрессия антител к IGF-1R.

Клеточные линии.

Родительская клеточная линия, применяемая для создания клеточной линии для рекомбинантной экспрессии IgG, представляла собой клетки яичника китайского хомячка (CHO), такие как CHO-DG44 (Flintoff W.F. и др., Somat. Cell Genet. 2, 1976, сс. 245-261; Flintoff и др., Mol. Cell. Biol. 2, 1982, сс. 275-285; Urlaub G. и др., Cell 33, 1983, сс. 405-412; Urlaub G. и др., Somat. Cell Mol. Genet. 12, 1986, сс. 555-566). У клеток CHO-DG44 отсутствовали оба эндогенных локуса фермента дигидрофолатредуктазы (DHFR).

Клетки CHO-DG44 выращивали в среде MEM альфа минус (фирма Gibco, № 22561), дополненной 10% подвергнутой диализу FCS (фирма Gibco, № 26400-044) и 2 ммоль/л L-глутамина, 100 мкМ гипоксантином, 16 мкМ тимидином (НТ-добавка).

Плазмиды.

Система экспрессии содержала промотор CMV и описана в приведенной ниже таблице. В качестве антитела применяли антитело к IGF-1R (WO 2005/005635; AK18 или AK22).

Количество пар оснований	Элемент плазмиды/ДНК-сегмент
1-26	Уникальные сайты рестрикции: SgrAI, Sse8387I
27-614	Промотор человеческого цитомегаловируса (HCMV) (CMV-Prom) включая IE-промотор человеческого CMV, включая синтетическую 5'-UTR
615-641	Линкер
642-780	Лидерная последовательность тяжелой цепи мышиного Ig (L1, сигнальная последовательность интрона, L2)
642-686	L1
687-768	Сигнальный интрон (SS-интрон)
769-780	L2
781-1105	Вариабельный домен легкой к-цепи антитела к IGF-1R (AK18)
1106-1140	Линкер
1141-3134	Интрон 2 гибрида человеческая/мышиная легкая к-цепь
2433-2913	Фрагмент к-энхансера
3135-3475	Линкер
3476-3795	Константная область легкой к-цепи (C-каппа)
3796-4098	Последовательность полиаденилирования легкой к-цепи человеческого Ig (C-каппа pA)
4099-4137	Линкер
4138-5800	Ген, определяющий устойчивость к гиромоцину
4138-4485	Промотор SV40 (SV40 Prom), включая состоящий из 72 пар оснований повтор, TATA, из SV40
4486-4502	Линкер
5403-5528	Ген гиромоцин-В-фосфотрансферазы (Hug)
5529-5535	Линкер
5536-5795	Сигнал полиаденилирования SV40 (SV40 pA)
5796-5800	Линкер
5801-6944	Ген мышиной дигидрофолатредуктазы (DHFR)
5801-6088	Промотор SV40 (SV40 Prom), включая состоящий из 72 пар оснований укороченный повтор, из SV40
6089-6105	Линкер
6106-6672	Ген мышиной DHFR (мышиная DHFR)
6673-6679	Линкер
6680-6944	Сигнал полиаденилирования SV40 (SV40 pA)
6945-7181	Линкер
7182-8941	Бактериальный сайт инициации репликации и селективный маркер, происходящий из плазмиды pUC18
7182-7792	Сайт инициации репликации («pUC origin»)
7793-7939	Линкер
7940-8847	Ген β-лактамазы (Ap(r))
8848-8941	Линкер
8942-9529	Промотор человеческого цитомегаловируса (HCMV) (CMV-Prom), включая IE-промотор человеческого CMV, включая синтетическую 5'-UTR
9530-9556	Линкер
9557-9696	Лидерная последовательность тяжелой цепи мышиного Ig (L1, сигнальная последовательность интрона, L2)
9557-9602	L1
9603-9685	Сигнальный интрон (SS-интрон)
9686-9696	L2
9697-10051	Вариабельный домен тяжелой цепи IgG1 антитела к IGF-1R (AK18)
10052-10085	Линкер
10086-11682	Интрон 2 гибрида человеческая/мышиная тяжелая цепь 2, включая часть области J-сегмента тяжелой цепи мышиного Ig, включая энхансерный элемент тяжелой цепи Ig (часть JH3, JH4)
11683-11909	Энхансерный элемент тяжелой цепи мышиного Ig
11910-13504	Линкер
11910-12203	Константная область тяжелой цепи человеческого IgG1 (CH1-шарнир-CH2-CH3)
12594-12638	CH1
12757-13086	Шарнир
13184-13504	CH2
13505-13967	CH3 (удален сайт альтернативного сплайсинга)
13968-13970	Последовательность полиаденилирования тяжелой цепи человеческого IgG1 (IgG1 pA)
	SgrAI-Линкер

Кратковременные трансфекции в НЕК293-системе.

Антитела создавали путем кратковременной трансфекции с помощью соответствующих плазмид (например, кодирующих тяжелую цепь и/или модифицированную тяжелую цепь, а также соответствующую легкую цепь), используя НЕК293-F-систему (фирма Invitrogen), согласно инструкции производителя. В целом, метод состоял в следующем: клетки НЕК293-F (фирма Invitrogen), растущие в суспензии либо во встряхиваемой колбе, либо в ферментере с перемешивающим устройством в бессывороточной среде для экспрессии FreeStyle™ 293 (фирма Invitrogen), трансфектировали смесью из 2 или 3 соответствующих экспрессионных плазмид и 293 fectin™ или фектина (фирма Invitrogen). В 2-литровую встряхиваемую колбу (фирма Corning) высевали НЕК293-F-клетки с плотностью 1,0×10⁶ клеток/мл в 600 мл и

инкубировали при 120 об/мин, 8% CO₂. Через день клетки трансфектировали при клеточной плотности примерно 1,5×10 клеток/мл, используя примерно 42 мл смеси, содержащей А) 20 мл среды Opti-MEM (фирма Invitrogen) с 600 мкг общей плазмидной ДНК (1 мкг/мл), кодирующей тяжелую или модифицированную тяжелую цепь соответственно, и соответствующую легкую цепь в эквимольном соотношении, и Б) 20 мл Opti-MEM + 1,2 мл 293fectin™ (2 мкл/мл). В зависимости от поглощения глюкозы в процессе ферментации добавляли раствор глюкозы. Супернатант, содержащий секретированное антитело, собирали через 5-10 дней и антитела либо очищали непосредственно из супернатанта или супернатант замораживали и помещали на хранение.

Очистка.

Антитела очищали из супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии, используя MabSelectSure-Sepharose™ (для не-AAA-мутантов) (фирма GE Healthcare, Швеция) или kappaSelect-агарозу (для AAA-мутантов) (фирма GE Healthcare, Швеция), хроматографии гидрофобных взаимодействий с использованием бутил-сефарозы (фирма GE Healthcare, Швеция) и гель-фильтрации на смоле супердекс 200 (фирма GE Healthcare, Швеция).

В целом, метод состоял в следующем: полученные после стерилизации фильтрацией супернатанты клеточных культур "захватывали" с помощью смолы MabSelect SuRe, уравновешенной 3ФР-буфером (10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl и 2,7 mM KCl, pH 7,4), промывали буфером для уравновешивания и элюировали 25 mM цитратом натрия, pH 3,0. Антитела с AAA-мутацией "захватывали" с помощью смолы KappaSelect, уравновешенной 25 mM Трис, 50 mM NaCl, pH 7,2, отмывали буфером для уравновешивания и элюировали 25 mM цитратом натрия, pH 2,9. Элюированные белковые фракции объединяли и нейтрализовали 2М Трис, pH 9,0. Фракции, содержащие пулы антитела, объединяли и дополнительно очищали с помощью гель-фильтрации, используя колонку, заполненную смолой супердекс 200 26/60 GL (фирма GE Healthcare, Швеция), уравновешенную 20 mM гистидином, 140 mM NaCl, pH 6,0. Фракции, содержащие антитело, объединяли, концентрировали до требуемой концентрации, используя устройства для ультрафильтрации Vivaspin (фирма Sartorius Stedim Biotech S.A., Франция), и хранили при -80°C.

Чистоту и целостность антитела анализировали после каждой стадии очистки с помощью капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (КЭ-ДСН), используя технологию микропотокa Labchip (фирма Caliper Life Science, США). 5 мкл белкового раствора подготавливали для КЭ-ДСН-анализа, используя набор реагентов HT Protein Express согласно инструкциям производителя и анализировали с помощью системы LabChip GXII, используя чип HT Protein Express. Данные анализировали с помощью программы LabChip GX.

Пример 4. Фармакокинетическое исследование (ФК) антител <IGF-1R>, полученные на мышах, трансгенных по huFcRn.

Фаза прижизненных исследований.

Опыт проводили на самках мышей C57BL/6J (фон); мышей с дефицитом FcRn, но гемизиготных трансгенных по человеческому FcRn (huFcRn, линия 276 -/tg).

Животные: C57BL/6J-мыши с "выключенным" muFcRn, трансгенные по huFcRn, линия 276, гетерозиготные, самцы и самки.

Соединения: HuMab<IGF-1R> wt, <IGF-1R_YTE> и <IGF-1R_AAA>.

Доза: 10 мг/кг веса тела, однократное болюсное i.v.-введение (вводимый объем: 10 мл/кг веса тела).

Концентрация: 1 мг/мл для опытов, в которых применяли i.v.-введение.

Часть 1.

Всем мышам инъецировали однократно интравитреально в правый глаз соответствующий раствор <IGF-1R>, <IGF-1R_YTE> (антитело к IGF-1R с мутацией YTE) и <IGF-1R_AAA> (антитело к IGF-1R мутацией ИНН-AAA) из расчета 1 мкл/животное.

Мышей разделяли на 2 группы по 6 животных в каждой. Получали образцы крови у животных группы 1 через 2, 24 и 96 ч, а у животных группы 2 через 7, 48 и 168 ч после дозирования.

Осуществляли инъекцию в стекловидное тело правого глаза мышей с помощью включающей микрошприц системы NanoFil для нанолитровых инъекций фирмы World Precision Instruments, Inc., Берлин, Германия. Мышей анестезировали с помощью 2,5% изофлурана, и для визуализации глаза мышей применяли микроскоп Leica MZFL 3 с 40-кратным увеличением и источником кольцевого света Leica KL 2500 LCD. Затем 2 мкл соединения инъецировали с помощью иглы 35-размера.

Кровь собирали из ретробульбарного венозного сплетения контралатерального глаза каждого животного для определения уровней соединения в сыворотке.

Образцы сыворотки объемом по меньшей мере 50 мкл получали из крови после выдерживания в течение 1 ч при КТ путем центрифугирования (9300×g) при 4°C в течение 3 мин. Образцы сыворотки замораживали непосредственно после центрифугирования и хранили в замороженном состоянии при -80°C до анализа. Обработанные глаза животных из группы 1 выделяли через 96 ч после обработки, у животных из группы 2 - через 168 ч после обработки. Образцы хранили в замороженном состоянии при -80°C до анализа.

Часть 2.

Всем мышам инъецировали однократно внутривенно через хвостовую вену в соответствующем количестве раствор антитела (т.е. 1 мг/мл, доза 10 мг/кг веса тела, вводимый объем 200 мкл).

Мышей разделяли на 3 группы по 8 животных в каждой. Получали образцы крови у животных группы 1 через 0, 24 и 336 ч, группы 2 - через 2, 168 и 504 ч и группы 3 - через 8, 48 и 672 ч после дозирования. Кровь собирали из ретробульбарного венозного сплетения контралатерального глаза каждого животного для определения уровней соединения в сыворотке.

Образцы сыворотки объемом по меньшей мере 50 мкл получали из крови после выдерживания в течение 1 ч при КТ путем центрифугирования (9300×g) при 4°C в течение 3 мин. Образцы сыворотки замораживали непосредственно после центрифугирования и хранили в замороженном состоянии при -80°C до анализа.

Получение лизатов всего глаза (мышей).

Лизаты глаз получали путем физико-химического расщепления всего глаза лабораторных животных. Для механического разрушения каждый глаз переносили в микропробирку с коническим дном объемом 1,5 мл. После замораживания и оттаивания глаза промывали однократно 1 мл промывочного буфера для клеток (фирма Bio-Rad, набор для лизиса клеток Bio-Plex, каталожный № 171-304011). На следующей стадии добавляли 500 мкл свежеприготовленного буфера для лизиса клеток и глаза измельчали с помощью 1,5-миллилитрового пестика для измельчения тканей (фирма VWR Int., артикул № 431-0098). Затем смесь 5 раз подвергали замораживанию и оттаиванию и вновь измельчали. Для отделения лизата от оставшейся ткани образцы центрифугировали в течение 4 мин при 4500×g. После центрифугирования супернатант собирали и хранили при -20°C для дополнительного анализа с помощью количественного ELISA.

Анализ.

Концентрации антител <IGF-1R> в сыворотке и лизатах глаз мышей определяли с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA).

Для количественной оценки антител <IGF-1R> в образцах сыворотки и лизатах глаз мышей осуществляли стандартный твердофазный серийный сэндвич-иммуноанализ с применением биотинилированных и дигоксигенированных моноклональных антител в качестве иммобилизованного ("захватывающего") и идентифицирующего антител. Связанный иммунный комплекс, включающий "захватывающее" антитело, аналит и идентифицирующее антитело, на твердой фазе сенсibilизированного стрептавидинового титрационного микропланшета (SA-MTP) затем выявляли с помощью сшитого с пероксидазой из хрена антитела к дигоксигенину. После отмывки несвязанного материала из SA-MTP и добавления ABTS-субстрата полученный сигнал пропорционален количеству аналита, связанного с твердой фазой SA-MTP. Затем осуществляли количественную оценку путем превращения измеренных сигналов образцов в концентрации, определенные относительно калибраторов, анализируемых параллельно.

На первой стадии SA-MTP сенсibilизировали, используя 100 мкл/лунку раствора биотинилированного "захватывающего" антитела (MAT<hFC_γPAN>IgG-Bi), на шейкере для MTP. Параллельно подготавливали калибраторы, QC-образцы (образцы для контроля качества) и образцы. После сенсibilизации SA-MTP "захватывающим" антителом планшет промывали трижды промывочным буфером. Затем с помощью пипетки вносили по 100 мкл/лунку калибраторов, QC-образцов и образцов в SA-MTP и вновь инкубировали в течение 1 ч при 500 об/мин. При этом аналит связывался через "захватывающее" антитело с твердой фазой SA-MTP. После инкубации и удаления несвязанного аналита путем промывки планшета в SA-MTP добавляли по 100 мкл/лунку первого идентифицирующего антитела (MAT<hFC_γPAN>IgG-Dig). И в этом случае планшет инкубировали в течение 1 ч при 500 об/мин на шейкере. После промывки в лунки SA-MTP добавляли по 100 мкл/лунку второго идентифицирующего антитела (ПАТ<дигоксигенин>S-Fab-POD (поли)) в концентрации 50 мед./мл и планшет вновь инкубировали в течение 1 ч при 500 об/мин. После конечной стадии промывки для удаления избытка идентифицирующего антитела добавляли по 100 мкл/лунку субстрата (ABTS®). Конъюгат антитело-фермент катализировал цветную реакцию ABTS®-субстрата. Затем сигнал измеряли с помощью ридера для ELISA при длине волны 405 нм (длина референс-волны: 490 нм ([405/490] нм)).

Оценка фармакокинетики.

Фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью некомпартментального анализа, используя программу для оценки фармакокинетических параметров WinNonlin™ (фирма Pharsight), версия 5.2.1.

Пример 5. Фармакокинетические (ФК) свойства антител с ННУ-ААА-мутацией.

ФК-данные в отношении FcRn, полученные на мышах, трансгенных по человеческому FcRn.

Фаза прижизненных исследований.

Опыт проводили на самках мышей C57BL/6J (фон); мышей с дефицитом FcRn, но гемизиготных трансгенных по человеческому FcRn (huFcRn, линия 276 -/tg).

Часть 1.

Всем мышам инъецировали однократно интравитреально в правый глаз соответствующий раствор

IGF-1R 0033, IGF-1R 0035, IGF-1R 0045 (т.е. 22,2 мкг соединения/на животное для IGF-1R 0033, 24,4 мкг соединения/на животное для IGF-1R 0035, 32,0 мкг соединения /на животное для IGF-1R и 32,0 мкг соединения/на животное для IGF-1R 0045).

Тринадцать мышей разделяли на 2 группы, соответственно 6 и 7 животных в каждой. Получали образцы крови у животных группы 1 через 2, 24 и 96 ч, а у животных группы 2 через 7, 48 и 168 ч после дозирования.

Осуществляли инъекцию в стекловидное тело правого глаза мышей с помощью включающей микрошприц системы NanoFil для нанолитровых инъекций фирмы World Precision Instruments, Inc., Берлин, Германия. Мышей анестезировали с помощью 2,5% изофлурана и для визуализации глаза мышей применяли микроскоп Leica MZFL 3 с 40-кратным увеличением и источником кольцевого света Leica KL 2500 LCD. Затем 2 мкл соединения инъецировали с помощью иглы 35-размера.

Кровь собирали из ретробульбарного венозного сплетения контралатерального глаза каждого животного для определения уровней соединения в сыворотке.

Образцы сыворотки объемом по меньшей мере 50 мкл получали из крови после выдерживания в течение 1 ч при КТ путем центрифугирования (9300×g) при 4°C в течение 3 мин. Образцы сыворотки замораживали непосредственно после центрифугирования и хранили в замороженном состоянии при -80°C до анализа. Обработанные глаза животных из группы 1 выделяли через 96 ч после обработки, у животных из группы 2 - через 168 ч после обработки. Образцы хранили в замороженном состоянии при -80°C до анализа.

Часть 2.

Всем мышам инъецировали однократно внутривенно через хвостовую вену соответствующий раствор IGF-1R 0033, IGF-1R 0035, IGF-1R 0045 (т.е. 22,2 мкг соединения/на животное для IGF-1R 0033, 24,4 мкг соединения/на животное для IGF-1R 0035, 32,0 мкг соединения/на животное для IGF-1R и 32,0 мкг соединения/на животное для IGF-1R 0045).

Двенадцать мышей подразделяли на 2 группы по 6 животных в каждой. Получали образцы крови у животных группы 1 через 1, 24 и 96 ч, а у животных группы 2 через 7, 48 и 168 ч после дозирования. Кровь собирали из ретробульбарного венозного сплетения каждого животного для определения уровней соединения в сыворотке.

Образцы сыворотки объемом по меньшей мере 50 мкл получали из крови после выдерживания в течение 1 ч при КТ путем центрифугирования (9300×g) при 4°C в течение 3 мин. Образцы сыворотки замораживали непосредственно после центрифугирования и хранили в замороженном состоянии при -80°C до анализа.

Приготовление буфера для лизиса клеток.

Осторожно смешивали 100 мкл фактора 1, 50 мкл фактора 2 и 24,73 мл буфера для клеточного лизиса (все фирмы Bio-Rad, набор для лизиса клеток Bio-Plex, каталожный № 171-304011) и добавляли 125 мкл раствора PMSF (174,4 мг фенилметилсульфонилфторида, разведенного в 2,0 мл ДМСО).

Получение лизатов всего глаза (мышей).

Лизаты глаз получали путем физико-химического расщепления всего глаза лабораторных животных. Для механического разрушения каждый глаз переносили в микропробирку с коническим дном объемом 1,5 мл. После замораживания и оттаивания глаза промывали однократно 1 мл промывочного буфера для клеток (фирма Bio-Rad, набор для лизиса клеток Bio-Plex, каталожный № 171-304011). На следующей стадии добавляли 500 мкл свежеприготовленного буфера для лизиса клеток и глаза измельчали с помощью 1,5-миллилитрового пестика для измельчения тканей (фирма VWR Int., артикул № 431-0098). Затем смесь 5 раз подвергали замораживанию и оттаиванию и вновь измельчали. Для отделения лизата от оставшейся ткани образцы центрифугировали в течение 4 мин при 4500×g. После центрифугирования супернатант собирали и хранили при -20°C для дополнительного анализа с помощью количественного ELISA.

Анализ (сыворотка).

Для количественной оценки антител в образцах сыворотки мышей осуществляли стандартный твердофазный серийный сэндвич-иммуноанализ с применением биотинилированного и диоксигенированного моноклональных антител в качестве иммобилизованного ("захватывающего") и идентифицирующего антител. На долю сыворотки приходилось примерно 50% от объема всего образца крови.

Более конкретно, метод состоял в следующем: концентрации антител в образцах сыворотки мышей определяли с использованием специфического для человеческого-IgG (Fab) твердофазного иммуноферментного анализа. Сенсибилизированные стрептавидином титрационные микропланшеты инкубировали с биотинилированным моноклональным антителом к человеческому Fab(каппа) M-1.7.10-IgG, которое применяли в качестве "захватывающего" антитела, разведенного в буфере для анализа, в течение 1 ч при комнатной температуре при перемешивании. После трехкратной промывки забуференным фосфатом физиологическим раствором, дополненным полисорбатом 20 (Твин-20), добавляли различные разведения образцов сыворотки с последующей второй инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. После трех повторяющихся промывок связанное антитело выявляли путем последующей инкубации с моно-

клональным антителом к человеческому Fab(CH1) M-1.19.31-IgG, конъюгированному с дигоксигенином, а затем с антителом к дигоксигенину, конъюгированному с пероксидазой из хрена (HRP). ABTS (2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота); фирма Roche Diagnostics GmbH, Маннгейм, Германия) применяли в качестве субстрата для HRP для осуществления реакции, в результате которой образуется окрашенный продукт. Абсорбцию образовавшегося реакционного продукта определяли при 405 нм (ABTS; длина референс-волны: 490 нм).

Все образцы и образцы, представляющие собой положительные и отрицательные контроли, анализировали с использованием повторностей и калибровали относительно применяемого в качестве стандарта антитела.

Анализ (лизат глаза).

Концентрации аналитов в образцах лизатов глаз мышей определяли с помощью пригодного электрохемиллюминисцентного иммуноанализа (ECLIA), основой которого служила инструментальная платформа ELECSYS® (фирма Roche Diagnostics GmbH, Маннгейм, Германия) в условиях, не соответствующих GLP (свод международных требований к лабораторным исследованиям).

Неразведенный супернатант (лизаты глаз) инкубировали с "захватывающими" и идентифицирующими молекулами в течение 9 мин при 37°C. Биотинилированное моноклональное антитело к человеческому Fab(каппа) M-1.7.10-IgG применяли в качестве "захватывающей" молекулы, а меченное рутений(II)три(биспиридилом)₃²⁺ моноклональное антитело к человеческому Fab(CH1) M-1.19.31-IgG применяли для идентификации. Добавляли сенсibilизированные стрептавидином магнитные микрочастицы и инкубировали в течение еще 9 мин при 37°C, давая связаться предварительно образованным иммунным комплексам благодаря взаимодействиям биотин-стрептавидин. Микрочастицы "захватывались" посредством магнитного взаимодействия на электроде и генерировали хемиллюминисцентный сигнал с использованием кореактанта трипропиламина (TPA). Собранные сигналы измеряли с помощью детектора-фотоумножителя.

Таблица стандартов IGF-1R 0033

	Концентрация [нг/мл]	Средний уровень сигналов	Стандартное отклонение уровня сигналов	Концентр.в сыворотке [нг/мл]	Выход [%]
Стандартный образец 9	0	1038	46	-	-
Стандартный образец 8	0,686	2682	105	0,675	98
Стандартный образец 7	2,06	6275	791	2,06	100
Стандартный образец 6	6,17	15907	316	6,23	101
Стандартный образец 5	18,5	45455	1238	18,8	102
Стандартный образец 4	55,6	133940	949	55,7	100
Стандартный образец 3	167	388069	2929	165	99
Стандартный образец 2	500	1129804	16777	503	101
Стандартный образец 1	1500	2956965	60287	1499	100

Таблица стандартов IGF-1R 0035

	Концентрация [нг/мл]	Средний уровень сигналов	Стандартное отклонение уровня сигналов	Концентр.в сыворотке [нг/мл]	Выход [%]
Стандартный образец 9	0	1024	63	-	-
Стандартный образец 8	0,686	2817	38	0,681	99
Стандартный образец 7	2,06	6451	39	2,08	101
Стандартный образец 6	6,17	17100	319	6,13	99
Стандартный образец 5	18,5	49693	713	18,6	100
Стандартный образец 4	55,6	146746	2575	56,1	101
Стандартный образец 3	167	423597	5068	165	99
Стандартный образец 2	500	1224244	11655	502	100
Стандартный образец 1	1500	3144901	44536	1499	100

Таблица стандартов IGF-1R 0045

	Концентрация [нг/мл]	Средний уровень сигналов	Стандартное отклонение уровня сигналов	Концентр.в сыворотке [нг/мл]	Выход [%]
Стандартный образец 9	0	1339	545	-	-
Стандартный образец 8	0,686	3108	61	0,622	91
Стандартный образец 7	2,06	7032	189	1,93	94
Стандартный образец 6	6,17	19175	750	6,10	99
Стандартный образец 5	18,5	55526	823	18,7	101
Стандартный образец 4	55,6	158591	5412	55,7	100
Стандартный образец 3	167	456316	28759	167	100
Стандартный образец 2	500	1274801	47532	499	100
Стандартный образец 1	1500	3280452	239523	1501	100

Результаты.

А) Концентрации в сыворотке.

Данные о концентрациях в сыворотке представлены в приведенных ниже таблицах и на фиг. 2.

IGF-1R 0033 (без INH-AAA-мутации): сравнение концентраций в сыворотке после интравитреального и внутривенного введения

	Концентрация в сыворотке после <u>интравитреального</u> введения	Концентрация в сыворотке после <u>внутривенного</u> введения
Время	Средняя конц. [мкг/мл]	Средняя конц. [мкг/мл]
1 ч	n.d.	34,7
2 ч	5,9	n.d.
7 ч	11,1	24,7
24 ч	4,4	13,6
48 ч	7,5	12,6
96 ч	2,1	8,9
168 ч	2,9	6,2

IGF-1R 0035 (с NHY-AAA-мутацией в одном полипептиде Fc-области): сравнение концентраций в сыворотке после интравитреального и внутривенного введения

	Концентрация в сыворотке после <u>интравитреального</u> введения	Концентрация в сыворотке после <u>внутривенного</u> введения
Время	Средняя концентрация [мкг/мл]	Средняя концентрация [мкг/мл]
1 ч	n.d.	24,5
	Концентрация в сыворотке после <u>интравитреального</u> введения	Концентрация в сыворотке после <u>внутривенного</u> введения
Время	Средняя концентрация [мкг/мл]	Средняя концентрация [мкг/мл]
2 ч	7,3	n.d.
7 ч	7,9	16,1
24 ч	2,3	5,7
48 ч	1,7	2,9
96 ч	0,3	0,6
168 ч	0,1	0,2

IGF-1R 0045 (с ННУ-ААА-мутацией в обоих полипептидах Fc-области): сравнение концентраций в сыворотке после интравитреального и внутривенного введения

Время	Концентрация в сыворотке после интравитреального введения	Концентрация в сыворотке после внутривенного введения
	Средняя концентрация [мкг/мл]	Средняя концентрация [мкг/мл]
1 ч	n.d.	40,5
2 ч	13,2	n.d.
7 ч	9,6	21,7
24 ч	2,2	5,1
48 ч	0,9	0,7
96 ч	0,05	0,03
168 ч	0,01	BLQ

BLQ (ниже предела количественного определения).

Сравнение концентраций в сыворотке после внутривенного введения антител IGF-1R 0033, 0035 и 0045, стандартизованных относительно 1 мкг применяемого антитела

	IGF-1R 0033	IGF-1R 0035	IGF-1R 0045
Время	Средняя концентрация [нг/мл/мкг применяемого антитела]		
1 ч	1564	1006	1266
7 ч	1114	659	679
24 ч	613	234	160
48 ч	569	118	21
96 ч	399	26	1
168 ч	280	7	0

Результаты.

Б) Концентрации в глазных лизатах левых и правых глаз.

Результаты определения концентраций в глазных лизатах представлены в ниже в таблицах и на фиг.

3-5.

Концентрации IGF-1R 0033 (без ННУ-ААА-мутации) в глазных лизатах после интравитреального введения в правый глаз

Средние величины концентрации для n=7 (96 ч) и n=6 (196 ч) мышей		
Время	Средняя концентрация [нг/мл]	
96 ч	левый глаз	3,3
	правый глаз	99,5
168 ч	левый глаз	5,2
	правый глаз	144,9

Концентрации IGF-1R 0033 (без ННУ-ААА-мутации) в глазных лизатах после внутривенного введения

Средние величины концентрации для n=5 (96 ч) и n=6 (196 ч) мышей		
Время	Средняя концентрация [нг/мл]	
96 ч	левый глаз	12,7
	правый глаз	8,5
168 ч	левый глаз	9,7
	правый глаз	BLQ

BLQ (ниже предела количественного определения).

Концентрации IGF-1R 0035 (с ННУ-ААА-мутацией в одном полипептиде Fc-области) в глазных лизатах после интравитреального введения в правый глаз

Средние величины концентрации для n=6 мышей		
Время	Средняя концентрация [нг/мл]	
96 ч	левый глаз	1,1
	правый глаз	169,2
168 ч	левый глаз	0,3
	правый глаз	114,7

Концентрации IGF-1R 0035 (с ННУ-ААА-мутацией в одном полипептиде Fc-области)
в глазных лизатах после внутривенного введения

Средние величины концентрации для n=6 мышей		
Время		Средняя концентрация [нг/мл]
96 ч	левый глаз	3,7
	правый глаз	1,7
168 ч	левый глаз	1,4
	правый глаз	0,3

BLQ (ниже предела количественного определения).

Концентрации IGF-1R 0045 (с ННУ-ААА -мутацией в обоих полипептидах Fc-области)
в глазных лизатах после интравитреального введения в правый глаз

Средние величины концентрации для n=6 мышей		
Время		Средняя концентрация [нг/мл]
96 ч	левый глаз	1,4
	правый глаз	322,6
168 ч	левый глаз	1,4
	правый глаз	156,8

Концентрации IGF-1R 0045 (с ННУ-ААА-мутацией в обоих полипептидах Fc-области)
в глазных лизатах после внутривенного введения

Средние величины концентрации для n=6 мышей		
Время		Средняя концентрация [нг/мл]
96 ч	левый глаз	3,6
	правый глаз	1,3
168 ч	левый глаз	0,8
	правый глаз	0,4

BLQ - ниже предела количественного определения.

Концентрации IGF-1R 0033, 0035 и 0045 в глазных лизатах после интравитреального введения
в правый глаз, стандартизованные относительно 1 мкг применяемого антитела

		IGF-1R 0033	IGF-1R 0035	IGF-1R 0045
Время		Средняя концентрация [нг/мл]		
96 ч	Левый глаз	0,15	0,05	0,04
	Правый глаз	4,48	6,93	10,08
168 ч	Левый глаз	0,24	0,01	0,04
	Правый глаз	6,53	4,70	4,90

Обобщение результатов.

После интравитреального введения антител к IGF-1R 0035 и 0045, указанных в настоящем описании (с односторонней или двухсторонней ННУ-ААА-мутацией), обнаружены сходные концентрации (через 96 и 168 ч) в глазных лизатах по сравнению с антителом к IGF-1R без ННУ-ААА-мутации (IGF-1R 0033).

Кроме того, после интравитреального введения антител к IGF-1R 0035 и 0045, указанных в настоящем описании (с односторонней или двухсторонней ННУ-ААА-мутацией), обнаружен более быстрый клиренс и более короткое время полужизни в сыворотке по сравнению с антителом к IGF-1R без ННУ-ААА-мутации (IGF-1R 0033).

Хотя выше описаны некоторые детали изобретения, приведенные с целью иллюстрации и примера для простоты понимания, описание и примеры не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Описание всей процитированной патентной и научной литературы специально полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к IGF-1R, которое специфически связывается с человеческим IGF-1R и у которого элиминирована способность связываться с FcRn, где антитело к IGF-1R имеет:

а) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последователь-

ность SEQ ID NO: 56 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (HVR-L3), или

б) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (HVR-L3), или

в) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77 (HVR-L3), или

г) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 (HVR-L3), или

д) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 (HVR-H1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89 (HVR-H2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90 (HVR-H3), и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 (HVR-L1), аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 (HVR-L2) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93 (HVR-L3), или

е) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 02, и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 04, или

ж) тяжелую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 31-35 (HVR-H1), аминокислотные остатки 50-66 (HVR-H2) и аминокислотные остатки 99-107 (HVR-H3) из SEQ ID NO: 01, и легкую цепь антитела, содержащую в качестве HVR-участков аминокислотные остатки 24-34 (HVR-L1), аминокислотные остатки 50-56 (HVR-L2) и аминокислотные остатки 89-98 (HVR-L3) из SEQ ID NO: 03.

2. Антитело по п.1, где связывание антитела к IGF-1R с человеческим FcRn характеризуется величиной K_D , составляющей более 1,7 мкМ при pH 6.

3. Антитело по одному из пп.1, 2, где антитело имеет время удерживания на содержащей FcRn колонке для аффинной хроматографии, составляющее 3 мин или менее.

4. Антитело по одному из пп.1-3, где антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) или их комбинацию.

5. Антитело по одному из пп.1-4, где антитело к IGF-1R имеет по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области и по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A, S254W, S254R, H310A, H433A, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

6. Антитело по одному из пп.1-5, где антитело к IGF-1R имеет, по меньшей мере, мутации I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области по меньшей мере одну из мутаций L251D, M252T, I253A или S254W, S254R, H310A, H433A, N434G, N434L, H435A, Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области.

7. Антитело по одному из пп.1-6, где антитело содержит первый полипептид Fc-области и второй полипептид Fc-области, в котором

I) первый и второй полипептиды Fc-области дополнительно содержат мутацию Y436A, или

II) первый и второй полипептиды Fc-области дополнительно содержат мутации I253A, H310A и H435A, или

III) первый и второй полипептиды Fc-области дополнительно содержат мутации H310A, H433A и Y436A, или

IV) первый и второй полипептиды Fc-области дополнительно содержат мутации L251D, L314D и L432D, или

V) первый полипептид Fc-области дополнительно содержит мутацию Y436A, а второй полипептид Fc-области дополнительно содержит

а) мутации I253A, H310A и H435A, или

б) мутации H310A, H433A и Y436A, или

в) мутации L251D, L314D и L432D, или

VI) первый полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации I253A, H310A и H435A, а второй полипептид Fc-области дополнительно содержит

а) мутации H310A, H433A и Y436A или

б) мутации L251D, L314D и L432D, или

VII) первый полипептид Fc-области дополнительно содержит мутации H310A, H433A и Y436A, а второй полипептид Fc-области дополнительно содержит

а) мутации L251D, L314D и L432D.

8. Антитело по одному из пп.1-6, где антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат одну или две мутации, выбранные из I) группы I253A, H310A и H435A, или II) группы H310A, H433A и Y436A, или III) группы L251D, L314D и L432D (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) в первом полипептиде Fc-области, и одну или две мутации, выбранные из группы, содержащей мутации L251D, I253A, H310A, L314D, L432D, H433A, H435A и Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации в первом и втором полипептиде Fc-области в сочетании приводят к тому, что мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в Fc-области.

9. Антитело по одному из пп.1-6, где антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые оба содержат комбинацию мутаций I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D, или их комбинации в Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота), где либо все мутации находятся в первом или втором полипептиде Fc-области, либо одна или две мутации находятся в первом полипептиде Fc-области и одна или две мутации находятся во втором полипептиде Fc-области, в результате все мутации в первом и втором полипептиде Fc-области в сочетании приводят к тому, что мутации I) I253A, H310A и H435A, или II) H310A, H433A и Y436A, или III) L251D, L314D и L432D содержатся в Fc-области.

10. Антитело по одному из пп.1-6, где антитело содержит Fc-область, содержащую первый и второй полипептиды Fc-области, оба относящиеся к человеческому IgG1-подклассу или к человеческому IgG4-подклассу (происходящие из человеческого антитела), которые содержат комбинацию мутаций I253A/H310A/H435A, или H310A/H433A/Y436A, или L251D/L314D/L432D в первом, а также во втором полипептиде Fc-области (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота) или первый полипептид Fc-области содержит комбинации мутаций I253A/H310A/H435A и второй полипептид Fc-области содержит комбинацию мутаций H310A/H433A/Y436A (нумерация согласно системе нумерации на основе EU-индекса Кэбота).

11. Антитело по одному из пп.1-10, где антитело к IGF-1R содержит

а) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 62, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 63, или

б) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 70, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 71, или

в) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 78, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 79, или

г) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 86, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 87, или

д) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 94, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 95, или

е) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 05, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 07, или

ж) вариабельный домен тяжелой цепи VH, имеющий SEQ ID NO: 06, и вариабельный домен легкой цепи VL, имеющий SEQ ID NO: 08.

12. Антитело по одному из пп.1-11, в котором

1) первый полипептид Fc-области выбран из группы, содержащей полипептид Fc-области человеческого IgG1, полипептид Fc-области человеческого IgG2, полипептид Fc-области человеческого IgG3,

Y407V.

15. Антитело по одному из пп.1-14, в котором

I) первый полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 и второй полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или

II) первый полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 и второй полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, или

III) первый полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 и второй полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, или

IV) первый полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 и второй полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, или

V) первый полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 и второй полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, или

VI) первый полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 и второй полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или

VII) первый полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 и второй полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, или

VIII) первый полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 и второй полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, или

IX) первый полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 и второй полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, или

X) первый полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 и второй полипептид Fc-области имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

16. Применение антитела к IGF-1R по одному из пп.1-15 для ингибирования IGF-1R в глазу.

17. Применение антитела к IGF-1R по одному из пп.1-15 для лечения сосудистых глазных заболеваний.

18. Способ лечения пациента, который страдает сосудистыми глазными заболеваниями, посредством введения антитела к IGF-1R по одному из пп.1-15 пациенту, который нуждается в таком лечении.

19. Способ по п.18, включающий дополнительное введение индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, выбранного из группы, включающей триптофанил-тРНК-синтетазу (TrpRS), EyeOOI (пэгилированный анти-VEGF аптамер), скваламин, RETAANE™ (анекортава ацетат в виде депо-суспензии; фирма Alcon, Inc.), пролекарство комбретастатина A4 (CA4P), MACUGEN™, MIFEPREX™ (мифепристон-gu486), субтенон, триамцинолона ацетонид, интравитреальный кристаллический триамцинолона ацетонид, приномастат (AG3340-синтетический ингибитор матричных металлопротеиназ, фирма Pfizer), флуцинолона ацетонид (включая внутриглазной имплантат флуцинолона, фирма Bausch & Lomb/Control Delivery Systems), ингибиторы VEGFR (фирма Sugen), VEGF-Trap (фирма Regeneron/Aventis), ингибиторы тирозинкиназного рецептора VEGF, такие как 4-(4-бром-2-фторанилино)-6-метокси-7-(1-метилпиперидин-4-илметокси)хиназолин (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метилендол-5-илокси)-6-метокси-7-(3-пирролидин-1-илпропокси)хиназолин (AZD2171), ваталаниб (PTK787) и SU1 1248 (сунитиниб), линомид и ингибиторы функции интегрин β -3, и ангиостатин.

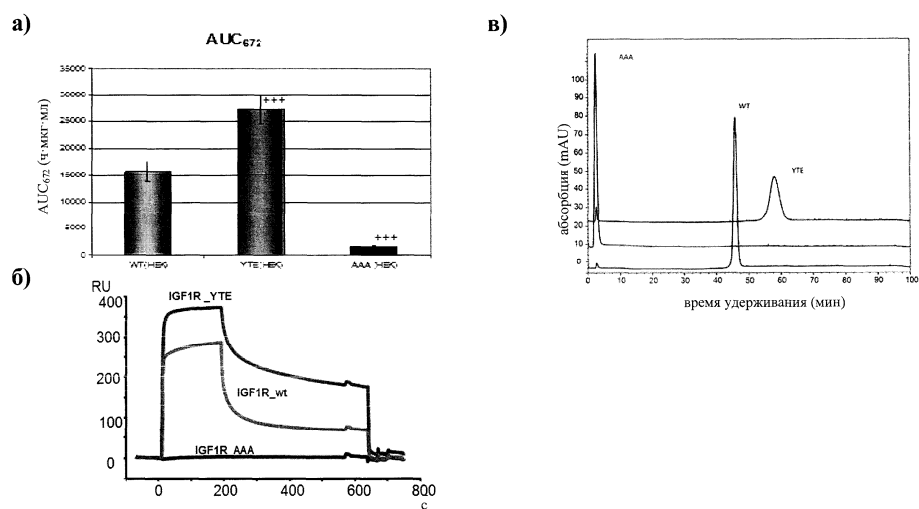
20. Фармацевтическая композиция для лечения сосудистых глазных заболеваний, содержащая антитело к IGF-1R по одному из пп.1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

21. Применение антитела к IGF-1R по одному из пп.1-15 для приготовления лекарственного средства для лечения сосудистых глазных заболеваний.

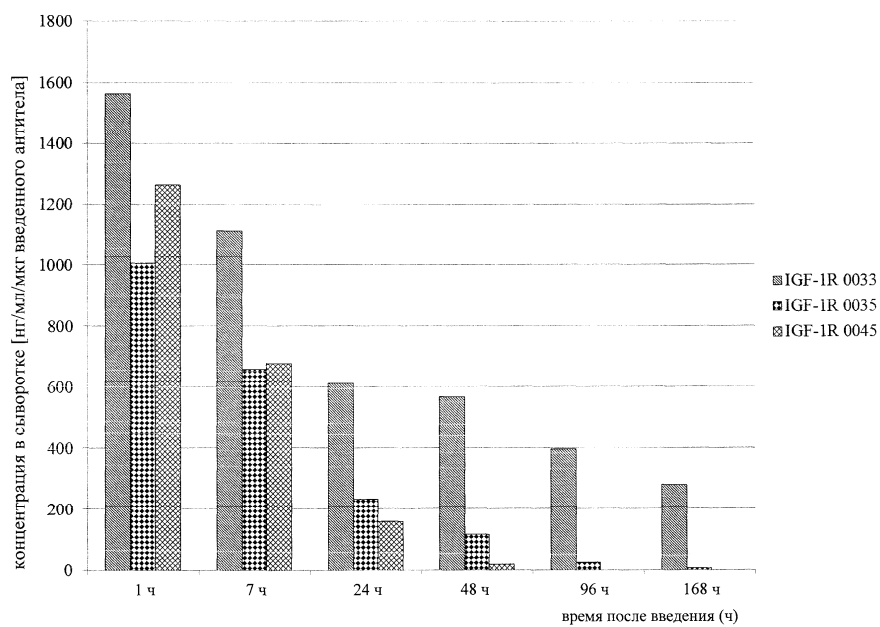
22. Способ ингибирования ангиогенеза в глазу индивидуума посредством ингибирования передачи сигналов IGF-1R, включающий введение индивидууму в эффективном количестве антитела к IGF-1R по одному из пп.1-15.

23. Способ по п.22, где введение представляет собой интравитреальное введение.

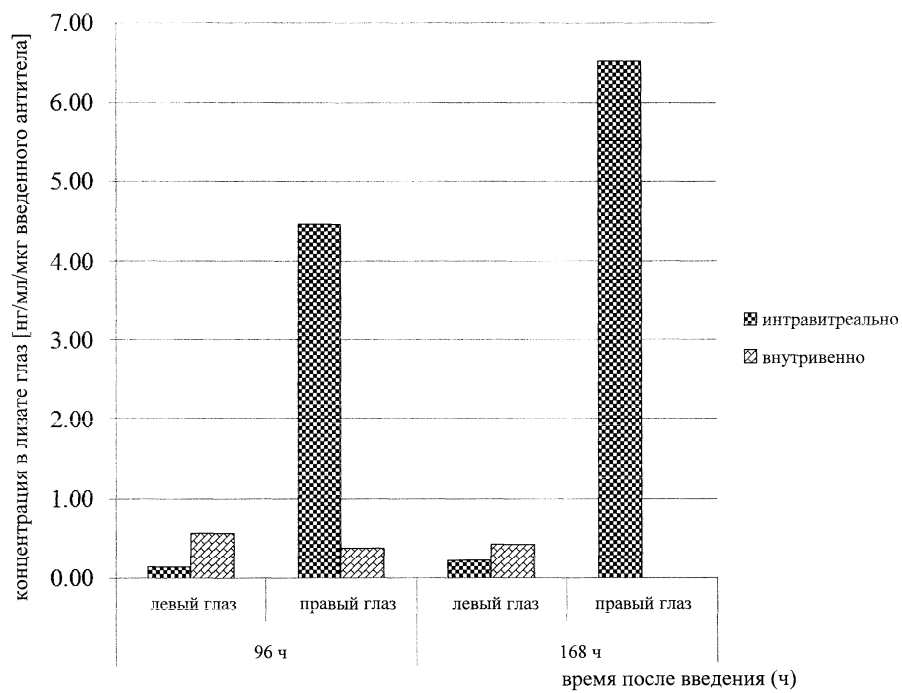
24. Применение антитела к IGF-1R по одному из пп.1-15 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для ингибирования ангиогенеза.



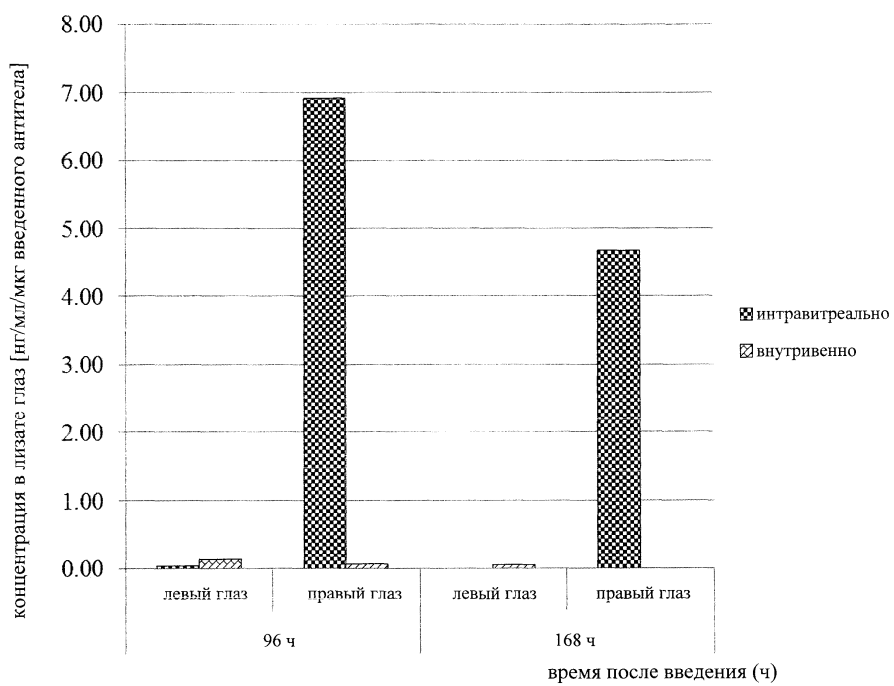
Фиг. 1



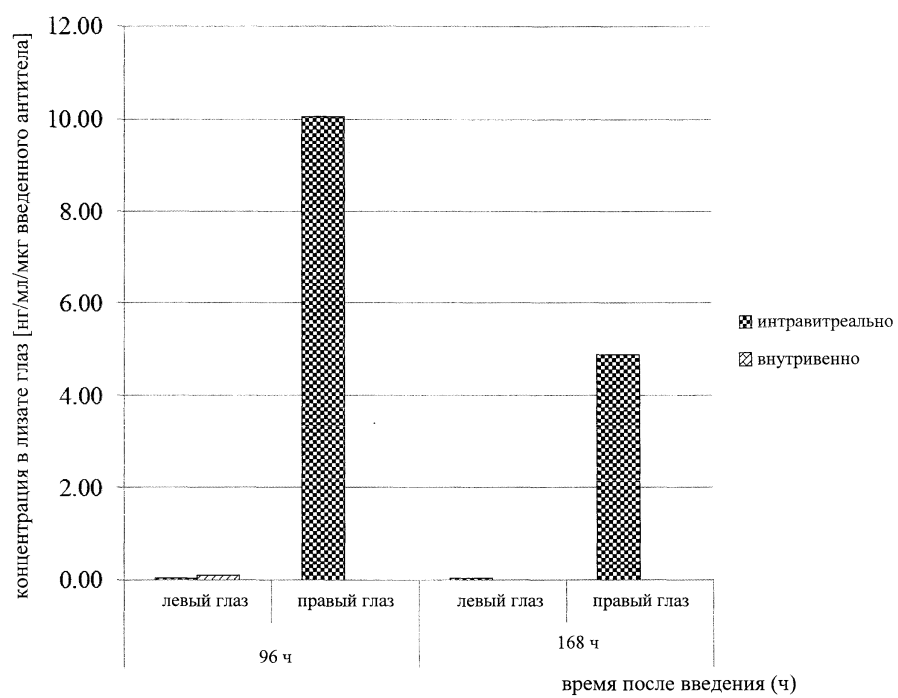
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

