

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291584** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.09.02

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.11.20

(54) **ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ**

(31) **62/939,756**

(72) Изобретатель:
Феррара Наполеоне (US)

(32) **2019.11.25**

(33) **US**

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

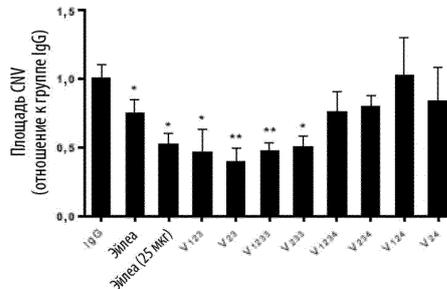
(86) **PCT/US2020/061519**

(87) **WO 2021/108255 2021.06.03**

(71) Заявитель:

**ДЗЕ РЕДЖЕНТС ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)**

(57) Композиции и способы лечения офтальмологического расстройства, связанного с VEGF, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение интравитреально субъекту терапевтически эффективного количества агента против VEGF, содержащего участок, связывающий VEGF, функционально связанный с Fc-IgG, причем участок, связывающий VEGF, содержит по меньшей мере один домен, связывающий VEGF, который представляет собой IgG-подобный домен 2 VEGFR-1.



A1

202291584

202291584

A1

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/939756, поданной 25 ноября 2019 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

10 Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Копия указанного файла ASCII, созданная 19 ноября 2020 г., называется 24978-0595_SL.txt и имеет размер 54480 байта.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к новым ингибиторам VEGF длительного действия для внутриглазной неоваскуляризации.

15 УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Развитие неоваскулярного подвода или ангиогенеза служит в качестве критических ролей гомеостаза, поскольку кровеносные сосуды переносят питательные вещества в ткани и органы и удаляют продукты катаболизма¹. Однако, неконтролируемый рост кровеносных сосудов может стимулировать или облегчать различные болезненные процессы, включая опухоли и внутриглазные сосудистые расстройства¹. Хотя многочисленные ангиогенные факторы исходно идентифицировали и характеризовали², в процессе работы, выполненной во многих лабораториях, было установлено, что VEGF является ключевым регулирующим элементом нормального и патологического ангиогенеза, а также сосудистой проницаемости^{3 4}. Альтернативное сплайсирование экзона приводит к образованию нескольких изоформ, которые отличаются по своей аффинности к гепарину, включая VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ и VEGF₁₈₉. У VEGF₁₂₁ отсутствует значительное связывание с гепарином. Тогда как VEGF₁₆₅ обладает единственным, кодируемым экзоном-7, гепарин-связывающим доменом, VEGF₁₈₉ обладает двумя гепарин-связывающими доменами, кодируемыми экзоном 6 и экзоном 7^{5 6}. Многочисленные экспериментальные факты подтверждают ключевую

20

25

30

роль связывающих гепарин изоформ VEGF в установлении биохимических градиентов, необходимых для ангиогенеза⁷⁻⁹. VEGF представляет собой член семейства генов, которое также включает PlGF, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D. Сообщалось, что три родственные рецепторные тирозинкиназы (RTK) связываются с лигандами VEGF: VEGFR1¹⁰, VEGFR2¹¹ и VEGFR3¹². VEGF связывается как с VEGFR1, так и с VEGFR2, тогда как PlGF и VEGF-B селективно взаимодействуют с VEGFR1. VEGFR3 связывается с VEGF-C и VEGF-D, которые вовлечены в лимфангиогенез^{13 14}. Каждый член этого класса RTK содержит семь иммуноглобулин (Ig)-подобных доменов во внеклеточной части¹⁵. Существует соглашение, что VEGFR-2 является основным сигнальным рецептором для VEGF¹⁴, хотя VEGFR1 связывается с VEGF со значительно большей аффинностью, чем VEGFR2¹⁵.

Ингибиторы VEGF стали стандартом лечения для большого количества опухолей и изменили лечение интраокулярных неоваскулярных расстройств, таких как неоваскулярная форма возрастной макулярной дистрофии (AMD), пролиферативная диабетическая ретинопатия и окклюзия вены сетчатки, которые являются основными причинами тяжелой потери зрения и узаконенной слепоты^{16 3 17}. На данный момент три лекарственных средства против VEGF широко используются в США для офтальмологических симптомов: бевацизумаб, ранибизумаб и афлиберцепт³. Бевацизумаб представляет собой антитело IgG полной длины, нацеленное на VEGF¹⁸. Хотя бевацизумаб не был разработан для офтальмологических симптомов, он широко применяется с нарушением инструкции по применению вследствие низкой стоимости. Ранибизумаб представляет собой Fab против VEGF со зрелой аффинностью¹⁹. Афлиберцепт представляет собой слитой белок IgG-Fc²⁰ с элементами от VEGFR1 и VEGFR2, которые связываются с VEGF, PlGF и VEGF-B²¹. Важно, после пятилетнего лечения ранибизумабом или бевацизумабом около половины пациентов с неоваскулярной AMD обладали хорошим зрением, т.е. остротой зрения 20/40 или более, что является результатом, который был не возможен до того, как агенты против VEGF стали доступными²². Однако, в реальных клинических условиях много пациентов получают меньше инъекций против VEGF, чем в клинических исследованиях, и возникла гипотеза, что это коррелирует с менее удовлетворительными результатами остроты зрения²³. Следовательно, существует необходимость в разработке агентов с большей длительностью после внутриглазной инъекции, таким образом уменьшая частоту инъекций, и некоторое количество подходов на данный момент было испробовано^{24 25}. Афлиберцепт (EYLEA, эйлеа) был

утвержден на основании клинических исследований, демонстрирующих, что каждое 8-недельное введение дозы 2 мг может соответствовать эффективности ранибизумаба один раз в месяц (0,5 мг). Однако, несмотря на предсказание, что переход на афлиберцепт будет снижать количество интравитреальных инъекций, недавние исследования свидетельствуют, что это не так²⁶. Следовательно, все еще существует нереализованная медицинская потребность в интравитреальных агентах против VEGF с улучшенным периодом полувыведения.

В 1996 г. в процессе исследований структура-функция, нацеленных на идентификацию элементов, связывающих VEGF, мы обнаружили, что делеция Ig-подобного домена (D) 2, но не остальных D, прекращала связывание VEGF или PlGF²⁷. Замена D2 из VEGFR3 на D2 из VEGFR1 придавала VEGFR3 лигандную специфичность VEGFR127. Последующие исследования продемонстрировали взаимодействие между D2 и VEGF (или PlGF) с помощью рентгеноструктурной кристаллографии²⁸⁻³⁰. Однако D3 являлся важным для оптимального связывания с VEGF^{27 28}. Эти первоначальные исследования привели к разработке конструкции, содержащей первые три Ig-подобные D из VEGFR1, слитые с Fc-IgG (Flt-1-3-IgG)²⁷. Flt-1-3-IgG продемонстрировал сильную способность нейтрализовать VEGF *in vitro* и в нескольких *in vivo* моделях физиологического и патологического ангиогенеза^{31-34 35 36}. Однако период полувыведения этой молекулы после системного введения был относительно коротким вследствие наличия кластеров основных остатков в D3, что приводило к связыванию с протеогликанами гепарансульфата (HSPG) и изоляции в различных тканях.

В 2002 г. Holash et al²¹ описал слитую конструкцию IgG, содержащую D2 VEGFR1 и D3 VEGFR2, которая обладала значительно меньшей аффинностью к гепарину, чем D3 VEGFR1. Сообщалось, что эта молекула, известная на данный момент как афлиберцепт, ziv-афлиберцепт или EYLEA, обладает значительно большим системным периодом полувыведения, чем Flt-(1-3-IgG)²¹. Эти ФК характеристики, объединенные с высокой аффинностью связывания с VEGF и способностью связывать PlGF и VEGF-B, приводили к допущению, что афлиберцепт будет являться более эффективным противоопухолевым агентом, чем другие ингибиторы VEGF^{21 37}. Однако афлиберцепт получил одобрение FDA только в качестве лечения 2-й линии колоректального рака, тогда как бевацизумаб и антитело к VEGFR2 рамуцирумаб получили несколько одобрений FDA при раковых заболеваниях различных типов^{3 17}, что свидетельствует о том, что вышеуказанные характеристики не обеспечивают терапевтического

преимущества. Несомненно, афлиберцепт обладает основным клиническим влиянием как интравитреальное лечение для глазных сосудистых расстройств.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 В данном изобретении предложены композиции и способы ингибирования ангиогенеза и для лечения VEGF-связанных патологических состояний, таких как глазные
заболевания, в том числе, но не ограничиваясь этим, возрастная макулярная
дегенерация, пролиферативная диабетическая ретинопатия, окклюзия вены сетчатки,
хориоидальная неоваскуляризация на фоне близорукости, ретинопатия недоношенных,
10 диабетический отек желтого пятна, полипообразная хориоидальная васкулопатия,
включающие введение агента против VEGF, который ингибирует активность VEGF и
в то же время обладает сильными гепарин-связывающими характеристиками, таким
образом обеспечивая превосходную фармакокинетику, а именно обладает более
длительным периодом полураспада терапевтического агента после интравитреального
введения.

15 В вариантах осуществления в данном изобретении предложены композиции и способы
лечения связанного с VEGF офтальмологического расстройства у субъекта,
нуждающегося в этом, включающие введение субъекту интравитреально первого
терапевтически эффективного количества агента против VEGF и введение
интравитреально субъекту второго терапевтически эффективного количества агента
20 против VEGF в течение от 10 до 30 недель после более раннего введения. В вариантах
осуществления изобретения агент против VEGF содержит участок, связывающий
VEGF, функционально связанный с Fc-IgG, при этом участок, связывающий VEGF,
содержит по меньшей мере один домен, связывающий VEGF, который представляет
собой IgG-подобный домен 2 VEGFR-1.

25 В вариантах осуществления изобретения второе терапевтически эффективное
количество агента против VEGF вводят интравитреально в течение от 16 до 24 недель
после более раннего введения. В вариантах осуществления изобретения способ
включает последовательное введение терапевтически эффективного количества агента
против VEGF, вводимого интравитреально в течение от 10 до 30 недель после
30 предшествующего введения в течение периода по меньшей мере один год.

В вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество
агента против VEGF составляет от около 1 до 10 мг. В вариантах осуществления

изобретения терапевтически эффективное количество агента против VEGF составляет от около 3 до 6 мг. В вариантах осуществления изобретения первое, второе и последующие терапевтически эффективные количества являются одинаковыми. В вариантах осуществления изобретения первое, второе и последующие терапевтически эффективные количества являются различными.

В вариантах осуществления в данном изобретении предложен агент против VEGF, при этом агент против VEGF представляет собой домены слияния конструкции Fc-IgG с характеристиками связывания VEGF и домены, которые связывают протеогликаны гепарина. В вариантах осуществления в данном изобретении предложен агент против VEGF, при этом агент против VEGF представляет собой конструкцию Fc-IgG, которая обладает способностью связывать гепарин и содержит один или более доменов с характеристиками связывания VEGF. В вариантах осуществления в данном изобретении предложен агент против VEGF, при этом агент против VEGF представляет собой слитой белок с улучшенной эффективностью к связыванию с VEGF и гепарином. В вариантах осуществления в данном изобретении предложен агент против VEGF, при этом агент против VEGF представляет собой слитой белок с очень низкими уровнями эндотоксинов.

В вариантах осуществления в данном изобретении предложен агент против VEGF, при этом агент против VEGF представляет собой химерный белок IgG, содержащий элементы рецепторов VEGF. В вариантах осуществления в данном изобретении предложен химерный белок IgG, при этом химерный белок IgG содержит один или более фрагментов семи (Ig)-подобных доменов иммуноглобулина во внеклеточной части рецепторов тирозинкиназы VEGF. В вариантах осуществления в данном изобретении предложен химерный белок IgG, при этом химерный белок IgG содержит один или более фрагментов внеклеточного домена VEGFR-1, слитых с Fc-IgG. В вариантах осуществления в данном изобретении предложен химерный белок, содержащий по меньшей мере один домен, связывающий VEGF, домен 2 VEGFR-1 и по меньшей мере один дополнительный домен 1 или 3 VEGFR-1 и не содержащий домен 4. В вариантах осуществления в данном изобретении предложен химерный белок IgG, при этом химерный белок IgG содержит один или более фрагментов внеклеточного домена VEGFR-2, слитых с Fc-IgG. В вариантах осуществления в данном изобретении предложен химерный белок IgG, при этом химерный белок IgG содержит один или более фрагментов внеклеточного домена VEGFR-1 и VEGFR-2, слитых с Fc-IgG.

В вариантах осуществления в данном изобретении предложен агент против VEGF, который содержит участок, связывающий VEGF, функционально связанный с Fc-IgG, при этом участок, связывающий VEGF, содержит по меньшей мере один домен, связывающий VEGF, который представляет собой IgG-подобный домен 2 VEGFR-1, и при этом агент против VEGF обладает способностью ингибировать стимулируемый VEGF митогенез, большей чем у афлиберцепта. В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что агент против VEGF обладает способностью связываться со стекловидным телом, большей чем у афлиберцепта. В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что агент против VEGF обладает способностью ингибировать пролиферацию эндотелиальных клеток, стимулируемую VEGF, связанную со стекловидным телом, большей чем у афлиберцепта. В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что агент обладает увеличенным периодом полувыведения *in vivo* по сравнению с афлиберцептом.

В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что участок, связывающий VEGF, состоит по существу из IgG-подобных доменов 1, 2 и 3 VEGFR-1 (V₁₋₂₋₃).

В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что участок, связывающий VEGF, состоит по существу из IgG-подобных доменов 2 и 3 VEGFR-1 (V₂₋₃).

В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что участок, связывающий VEGF, состоит по существу из IgG-подобных доменов 1, 2, 3 и 3 VEGFR-1 (V₁₋₂₋₃₋₃).

В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что участок, связывающий VEGF, состоит по существу из IgG-подобных доменов 2, 3 и 3 VEGFR-1 (V₂₋₃₋₃).

В вариантах осуществления в данном изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество агента против VEGF, как определено в формуле изобретения, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы лечения VEGF-связанного расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества агента против VEGF, как определено. Агент против VEGF можно непосредственно вводить в поражаемую ткань или орган, такой как глаз.

В вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ лечения глазного заболевания, при этом агент против VEGF местно вводят в глаз в дозировке, соответствующей молярному соотношению 2:1 по отношению к VEGF. В варианте осуществления в данном изобретении предложен способ лечения глазного заболевания, при этом агент против VEGF вводят путем интравитреальной инъекции.

В вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ лечения глазного заболевания, при этом агент против VEGF вводят интравитреально один раз каждые 10-30 недель. В вариантах осуществления изобретения агент против VEGF вводят интравитреально один раз каждые 16-24 недели. В вариантах осуществления изобретения лечение продолжают в течение периода, составляющего по меньшей мере один год.

В соответствии с одним вариантом осуществления в данном изобретении предложен способ лечения глазного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества агента против VEGF местно в глаз, при этом лечение является эффективным для лечения скрытой, минимально классической или в основном классической форм влажной макулодистрофии, при этом агент представляет собой слитой белок.

В вариантах осуществления изобретение можно применять для лечения широкого набора связанных с VEGF расстройств, в том числе неоваскулярной возрастной макулярной дистрофии, хориоидальной неоваскуляризации на фоне близорукости, пролиферативной диабетической ретинопатии, диабетического отека желтого пятна, обструкции сосудов сетчатки, такой как окклюзия вены сетчатки, глазных опухолей, синдрома фон Гиппеля-Линдау, ретинопатии недоношенных, полиповидной хориоидальной васкулопатии или расстройств, не относящихся к новообразованиям, которые получают пользу от терапии против VEGF.

В соответствии с другим аспектом в данном изобретении предложен фармацевтический состав, содержащий агент против VEGF в составе фармацевтически приемлемого носителя для местного введения, например, в глаз.

В вариантах осуществления в данном изобретении раскрыты новые конструкции, при этом конструкции сильно нейтрализуют активность VEGF, и в то же время обладают сильными гепарин-связывающими характеристиками.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1 иллюстрирует структуру иммуноглобулин (Ig)-подобного домена (D) VEGFR1 и конструкции слияния с Fc, разработанные в нашем исследовании. Красным обозначен домен, связывающий гепарин. D2 представляет собой незаменимый связывающий элемент для VEGF и PlGF, ответственный за специфичность к лиганду²⁷. D3 играет важную роль в аффинности и стабильности связывания^{27 28 30}. D3 VEGFR1, но не D3 VEGFR2, представляет собой основной гепарин-связывающий сайт. V23 и афлиберцепт (EYLEA, эйлеа) отличаются только в D3, который из VEGFR2 в афлиберцепте. D4 также представляет собой гепарин-связывающий сайт, вовлеченный в димеризацию рецептора и гомотипные взаимодействия³⁰. Каждая конструкция показана в виде мономера для простоты, но рекомбинантные белки являются димерами вследствие вынужденной димеризации, налагаемой Fc.

Фигуры 2А-2В демонстрируют характеристику очищенных рекомбинантных белков. Фигура 2А иллюстрирует окрашенный серебром ДСН/PAGE (4-20% Трис) наших очищенных рекомбинантных слитых белков и EYLEA. 200 нг каждого белка подвергали электрофорезу в восстановительных условиях. Окрашивание выполняли с помощью набора для окрашивания серебром SilverQuest (Invitrogen). Фигура 2В иллюстрирует аналитическую эксклюзионную хроматографию (SEC) V23, V233, V1233 и EYLEA, 25 мкг каждого. Ось Y представляет интенсивность поглощения (A280) в миллиединицах поглощения, а ось X представляет время элюирования в минутах.

Фигура 3 иллюстрирует величины IC₅₀ ингибитора. Хориоидальные эндотелиальные клетки быка хранили, как описано в подходе для анализов, клетки высевали при низкой плотности. Затем добавляют ингибиторы при различных концентрациях, как указано на фигуре. VEGF добавляют в конечной концентрации 10 нг/мл. Плотности клеток оценивают через 5 дней. Величины IC₅₀ рассчитывали с использованием GraphPad Prism 5 (программное обеспечение GraphPad, Калифорния). Представленные данные основаны на двух независимых экспериментах, выполненных с высокочистыми белками, и сопоставимы с многочисленными предыдущими анализами.

Фигура 4 иллюстрирует связывание со стекловидным телом быка.

5 Фигуры 5A-5D иллюстрируют влияние контрольного IgG, EYLEA или слитых белков Fc VEGFR1 на вызванную лазером хориоидальную неоваскуляризацию (CNV) у взрослых мышей. Фигура 5A иллюстрирует, что каждый белок вводили мыши интравитреально в дозе 2,5 мкг за один день до лазерного лечения. EYLEA также

10 тестировали при 25 мкг. Звездочка обозначает значительные различия (тест Стьюдента) по сравнению с подходящими контрольными группами IgG (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$). Данные основаны на трех независимых экспериментах с по меньшей мере 5 мышами на группу. Следует отметить, что эффективность EYLEA находится в соответствии с опубликованной в литературе в той же модели. Фигура 5B

15 иллюстрирует влияние времени инъекции до повреждения в области CNV. EYLEA в дозе 2,5 мкг обладала значительным снижением только при введении в день -1. Напротив, V1233 в той же дозе значительно снижал площадь CNV при инъекции за 7 дней или 14 дней до инъекции. Левая часть иллюстрирует типичные иммунофлуоресцентные изображения CD31. Звездочка обозначает значительные

20 различия (тест Стьюдента) по сравнению с подходящими контрольными группами IgG (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$). $n=5$. Подобные результаты были получены в двух независимых экспериментах. Фигура 5C иллюстрирует, что V23, V233 и V1233, протестированные в эквимоллярных дозах (4,8 мкг EYLEA и V23, 6,3 мкг V233 и 7,2 мкг V1233), демонстрируют большую эффективность по сравнению с EYLEA. Все агенты вводили

25 за 14 дней до лазерной обработки. Через семь дней глаза извлекали и данные анализировали. Звездочка обозначает значительные различия (тест Стьюдента) по сравнению с подходящими контрольными группами IgG (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$). Фигура 5D иллюстрирует уровни сыворотки EYLEA, V23, V233 или V1233 у мышей в различные моменты времени после интравитреальной инъекции. Каждую молекулу

30 вводили в оба глаза в эквимоллярных количествах: 2,4 мг EYLEA и V23, 3,15 мг V233 и 3,6 мг V1233. Через 1 день, 3 дня, 7 дней, 14 дней и 21 день из хвостовой вены забирали периферическую кровь. Уровни Fc человека измеряли с помощью ELISA. Показанные величины представляют собой средние \pm SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. $n=8$ на точку.

30 Фигуры 6A-6C иллюстрируют, что интравитреальные инъекции V1233 ингибируют неоваскуляризацию в модели OIR. Фигура 6A иллюстрирует, что интравитреальные инъекции осуществляли в P7 у мышей C57BL/6j с использованием афлиберцепта, V1233 и контроля (IgG). Объем 0,5 пл афлиберцепта (E) в дозе 12,5 мкг, 2,5 мкг или 1,25 мкг по отношению к контрольному IgG в дозе 3,25 мкг инъекцировали в другой

глаз. Животным из одного помета инъекировали V1233 (3,8 мкг или 1,65 пг) и контроль. Концентрации контроля IgG, афлиберцепта 2,5 мкг и V1233 3,8 мкг были эквимольными (см. также легенду к Фиг. 10). Затем животных подвергали 75% кислороду от P7 до P12 с последующим возвращением к воздуху комнаты. В P17 животных фиксировали перфузионно, затем удаляли глаза, разрезали, окрашивали с помощью BSL-FITC и устанавливали на плоской подложке. Фигура 6B иллюстрирует разрушение сосудов, а неоваскуляризацию анализировали с использованием автоматического программного обеспечения, как описано в Xiao et al. (ref. 116). Области разрушения сосудов показаны желтым цветом, а неоваскулярные пучки показаны красным. Фигура 6C иллюстрирует количественную оценку неоваскуляризации и демонстрирует значительное снижение ($p < 0,05$ t-тест с коррекцией по Велчу) неоваскуляризации относительно контроля при использовании V1233 (3,8 и 1,65 пг) или высокой дозы афлиберцепта (12,5 мкг), но не афлиберцепта при 2,5 или 1,25 мкг.

Фигура 7 демонстрирует ингибирующие эффекты слитого белка на пролиферацию BCEC, стимулируемую VEGF165 или VEGF121. Результаты выражены в % ингибирования стимулируемой VEGF пролиферации относительно контроля. Количества клеток определяли по относительным единицам флуоресценции (RFU) 530/590 (возбуждение/эмиссия), среднее трех параллельных.

Фигура 8 иллюстрирует ингибирующие эффекты рекомбинантных белков слияния рецептора VEGF и Fc на пролиферацию HUVEC. V123, V1233, V233, V23 или EYLEA (10-2000 нг/мл) добавляли вместе с VEGF165 (10 нг/мл) в течение 3 дней, и определяли жизнеспособность клеток. Результаты выражены в % ингибирования стимулируемой VEGF пролиферации относительно контроля. Количества клеток определяли по относительным единицам флуоресценции (RFU) 530/590 (возбуждение/эмиссия), среднее трех параллельных. Статистический анализ выполняли с помощью 2-факторного ANOVA с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Статистическая значимость * $p < 0,001$, ** $p < 0,0001$ была рассчитана путем сравнения только с VEGF.

Фигура 9 иллюстрирует, что кристаллическая структура комплекса VEGF/VEGFR2 (3V2A) была наложена на кристаллическую структуру комплекса VEGF/VEGFR1 (5T89). Отмечены остатки VEGFR1, которые могут потенциально взаимодействовать с VEGF и которые отличаются у VEGFR1 и VEGFR2. Отмечено желтым и синим: VEGF.

Отмечено зеленым: D2 VEGFR1. Белым: D3 VEGFR1. Анализ указывает на более сильное взаимодействие между VEGF и D3 VEGFR1 по сравнению с D3 VEGFR2.

5 Фигура 10 иллюстрирует эффекты V1233 на пролиферацию эндотелиальных клеток быка. Эндотелиальные клетки микрососудов сосудистой оболочки глаза быка (BCEC, VEC Technologies) высевали в 96-луночные планшеты в DMEM с низким содержанием глюкозы, дополненной 10% сыворотки теленка, и инкубировали с последовательными разведениями V1233 (партия 1 и партия 2) и EYLEA (Regeneron Pharmaceuticals) в присутствии 10 нг/мл hVEGF165 (R&D system). Через 5 или 6 дней клетки инкубировали с использованием аламарового синего в течение 4 ч. Флуоресценцию
10 измеряли при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны испускания 590 нм.

Фигура 11 иллюстрирует ингибирование индуцированной VEGF активации VEGFR2 в VEGF Promega. Биоанализ VEGF Promega (GA2001, Promega) использовали для измерения способности V1233 ингибировать стимуляцию, вызванную VEGF165 в KDR/NFAT-RE HEK293. Клетки инкубировали с последовательными разведениями
15 V1233 (партия 1 и партия 2), EYLEA и IgG1 человека (BE0297, BioXcell) в присутствии 20 нг/мл hVEGF165. После 6-часовой инкубации добавляли реагент Bio-Glo80, и количественно считывали люминесценцию с использованием ридера для микропланшетов SpectraMax M5. Данные аппроксимировали кривой 4PLx® с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

20 Фигура 12 иллюстрирует влияние гепарина на концентрации конструкций VEGFR1 в культуральной среде клеток CHO. Разделить основную массу клеток (V123, V1233, V233 и V23) в среде CD FortiCHO с 100 мкг/мл гепарина (№ H3149, Sigma) или без него и инкубировать при 37°C с 5% CO₂ в увлажненной атмосфере и при 125 об/мин в течение 96 часов. Культуральную среду собирали и экспрессию ECD VEGFR1
25 оценивали с помощью ELISA.

Фигура 13 иллюстрирует, что экспрессируемый в CHO V1233 является полностью активным в мышинной модели CNV. Использовали 6-8-недельных самцов мышей C57/Bl6 (n=6). После лазерной индукции ~5 мкг V₁₂₃₃, полученного из клеток CHO и клеток 293, инъецировали интравитреально (1 мкл) в каждый глаз. Через 10 дней собирали комплекс хориоидея-склера и фиксировали. На неоваскулярную область указывало CD31 иммунофлуоресцентное окрашивание тотального препарата. Фигура
30 иллюстрирует три репрезентативные неоваскулярные области в каждой группе.

Фигура 14 изображает аминокислотную последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты целого фрагмента IgG1-Fc человека и домена VEGFR-1 конструкции V_{1-2-3} . SEQ ID №: 1 и SEQ ID №: 2, соответственно. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот для IgG-подобных доменов VEGFR-1 представлены на фигуре, как описано. Аминокислотная последовательность V_1 представляет собой SEQ ID №: 15, аминокислотная последовательность конструкции V_2 представляет собой SEQ ID №: 16, и аминокислотная последовательность конструкции V_3 представляет собой SEQ ID №: 17.

Фигура 15 изображает аминокислотную последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты целого фрагмента IgG1-Fc человека и домена VEGFR-1 конструкции V_{2-3} . SEQ ID №: 3 и SEQ ID №: 4, соответственно. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот для IgG-подобных доменов VEGFR-1 представлены на фигуре, как описано. Аминокислотная последовательность V_2 представляет собой SEQ ID №: 16, и аминокислотная последовательность V_3 представляет собой SEQ ID №: 17.

Фигура 16 изображает аминокислотную последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты целого фрагмента IgG1-Fc человека и домена VEGFR-1 конструкции $V_{1-2-3-3}$. SEQ ID №: 5 и SEQ ID №: 6, соответственно. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот для IgG-подобных доменов VEGFR-1 представлены на фигуре, как описано. Аминокислотная последовательность V_1 представляет собой SEQ ID №: 15, аминокислотная последовательность V_2 представляет собой SEQ ID №: 16, и аминокислотная последовательность V_3 представляет собой SEQ ID №: 17.

Фигура 17 изображает аминокислотную последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты целого фрагмента IgG1-Fc человека и домена VEGFR-1 конструкции V_{2-3-3} . SEQ ID №: 7 и SEQ ID №: 8, соответственно. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот для IgG-подобных доменов VEGFR-1 представлены на фигуре, как описано. Аминокислотная последовательность V_2 представляет собой SEQ ID №: 16, и аминокислотная последовательность V_3 представляет собой SEQ ID №: 17.

Фигура 18 изображает аминокислотную последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты целого фрагмента IgG1-Fc человека и домена VEGFR-1 конструкции $V_{1-2-3-3-4}$. SEQ ID №: 9 и SEQ ID №: 10, соответственно. Аминокислотные

последовательности и последовательности нуклеиновых кислот для IgG-подобных доменов VEGFR-1 представлены на фигуре, как описано. Аминокислотная последовательность V₁ представляет собой SEQ ID №: 15, аминокислотная последовательность V₂ представляет собой SEQ ID №: 16, аминокислотная последовательность V₃ представляет собой SEQ ID №: 17, и аминокислотная последовательность V₄ представляет собой SEQ ID №: 18.

Фигура 19 изображает аминокислотную последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты целого фрагмента IgG1-Fc человека и домена VEGFR-1 конструкции V₂₋₃₋₄. SEQ ID №: 11 и SEQ ID №: 12, соответственно. Аминокислотная последовательность конструкции V₂ представляет собой SEQ ID №: 16, аминокислотная последовательность V₃ представляет собой SEQ ID №: 17, и аминокислотная последовательность V₄ представляет собой SEQ ID №: 18.

Фигура 20 изображает аминокислотную последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты целого фрагмента IgG1-Fc человека и домена VEGFR-1 конструкции V₂₋₄. SEQ ID №: 13 и SEQ ID №: 14, соответственно. Аминокислотная последовательность V₂ представляет собой SEQ ID №: 16, и аминокислотная последовательность V₄ представляет собой SEQ ID №: 18.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени как если бы было указано, что каждая индивидуальная публикация, патент или заявка на патент прямо и в отдельности включена посредством ссылки.

Если не указано иное, все технические и научные термины и любые сокращения, используемые в данном документе, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в области техники, к которой принадлежит изобретение. В данном документе описаны иллюстративные способы, устройства и материалы, хотя для практического осуществления данного изобретения можно использовать любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе.

При практическом осуществлении данного изобретения будут применяться, если не указано иное, традиционные методики молекулярной биологии (в том числе рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в рамках данной области техники. Такие методики

полностью описаны в литературе, как, например, молекулярное клонирование: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Sambrook et al., 1989); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, и периодические обновления); ПЦР: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al., eds., 1994); Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003), и Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22th ed., (Pharmaceutical Press and Philadelphia College of Pharmacy at University of the Sciences 2012).

10 При использовании в данном документе предполагается, что термины «содержит», «содержащий», «включает в себя», «включающий в себя», «имеет», «имеющий», «заклучает в себе», «заклучающий в себе», «характеризующийся» или любые другие их варианты охватывают неисключительное включение, при условии любого ограничения, явно указанного иным образом, перечисленных компонентов. Например, слитой белок, фармацевтическая композиция и/или способ, который «содержит»
15 перечень элементов (например, компонентов, признаков или стадий) не обязательно ограничен только теми элементами (или компонентами или стадиями), но может включать другие элементы (или компоненты или стадии), не явно перечисленные или присущие слитому белку, фармацевтической композиции и/или способу.

20 При использовании в данном документе, переходные фразы «состоит из» и «состоящий из» исключают любой элемент, стадию или компонент, которые не указаны. Например, «состоит из» или «состоящий из», используемые в пункте формулы изобретения, будет ограничивать формулу изобретения компонентами, материалами или стадиями, конкретно указанными в формуле изобретения, за
25 исключением примесей, обыкновенно связанных с ними (т.е. примесей конкретного компонента). Когда фраза «состоит из» или «состоящий из» появляется в клаузуле пункта формулы изобретения, а не в непосредственно следующей вводной части, фраза «состоит из» или «состоящий из» ограничивает только элементы (или компоненты или стадии), представленные в указанной клаузуле; другие элементы (или
30 компоненты) в целом не исключены из пункта формулы изобретения.

При использовании в данном документе, переходные фразы «состоит по существу из» и «состоящий по существу из» используются для определения слитого белка, фармацевтической композиции и/или способа, которые включают материалы, стадии, признаки, компоненты или элементы, в дополнение к тем, которые буквально

раскрыты, при условии что эти дополнительные материалы, стадии, признаки, компоненты или элементы существенно не влияют на основную и новую характеристику(-и) заявленного изобретения. Термин «состоит по существу из» занимает промежуточную позицию между «содержащий» и «состоящий из».

5 При представлении элементов по данному изобретению или их предпочтительных вариантов (варианта), подразумевается, что единственное число и «указанный» означают, что существует один или большее количество элементов. Подразумевается, что термины «содержащий», «включающий в себя» и «имеющий» являются охватывающими и означают то, что могут быть дополнительные элементы, отличные
10 от перечисленных элементов.

Термин «и/или», при использовании в перечне двух или более элементов, означает, что любой один из перечисленных элементов может использоваться сам по себе или в комбинации с одним или более из перечисленных элементов. Например, выражение «А и/или В» предназначено для обозначения как обоих А и В, т.е. А отдельно, В
15 отдельно, или А и В в комбинации. Выражение «А, В и/или С» предназначено для обозначения только А, только В, только С, А и В в комбинации, А и С в комбинации, В и С в комбинации или А, В и С в комбинации.

Понятно, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в данном документе, включают в себя «состоящие из» и/или «в основном состоящие из»
20 аспектов и вариантов осуществления.

Необходимо понимать, что описание в виде интервала представлено исключительно для удобства и краткости, и его не следует истолковывать как жесткое ограничение объема изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые
25 значения в пределах этого диапазона. Например, описание интервала, такого как от 1 до 6, необходимо рассматривать как конкретное описание подинтервалов, таких как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельных чисел внутри этого интервала, например 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Это применимо независимо от широты диапазона. Значения или диапазоны могут также выражаться в данном
30 документе, как «около», от «около» одного конкретного значения и/или до «около» другого конкретного значения. При выражении таких величин или диапазонов, другие раскрытые варианты осуществления включают конкретное представленное значение, от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Подобным

образом, когда значения выражаются как приближения путем использования предшествующего слова «около», следует понимать, что конкретное значение формирует другой вариант осуществления изобретения. Дополнительно будет понятно, что существует ряд величин, описанных в данном документе, и что каждая величина также описана в данном документе, как «около» этой указанной величины в дополнение к величине самой по себе. В некоторых вариантах осуществления изобретения «около» может применяться для обозначения, например, в рамках 10% от указанной величины, в рамках 5% от указанной величины или в рамках 2% от указанной величины.

10 При использовании в данном документе, «пациент» или «субъект» означает человека или субъекта, подлежащего лечению.

При использовании в данном документе, термин «фармацевтическая композиция» относится к фармацевтически приемлемым композициям, при этом композиция содержит фармацевтически активный агент, а в некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция может представлять собой комбинацию фармацевтически активных агентов и носителей.

Термин «комбинация» относится или к фиксированной комбинации в одной единичной лекарственной форме или к набору частей для комбинированного введения, при этом один или более активных соединений и партнер по комбинации (например, другое лекарственное средство, как описано ниже, также называемое «терапевтическим агентом» или «коагентом») можно вводить независимо в то же время или отдельно через временные интервалы. В некоторых случаях партнеры по комбинации иллюстрируют кооперативный, например синергетический эффект. Подразумевается, что термины «совместное введение» или «комбинированное введение» или тому подобное, как используется в данном документе, охватывают введение выбранного партнера по комбинации одному субъекту, нуждающемуся в этом, (например, пациенту) и предназначены для включения режимов лечения, при которых агенты не обязательно вводить тем же путем введения или в то же время. Термин «фармацевтическая комбинация», при использовании в данном документе, означает продукт, который образуется в результате смешивания или объединения более чем одного активного ингредиента, и включает как фиксированную, так и

нефиксированную комбинации активных ингредиентов. Термин «фиксированная комбинация» означает, что оба активных ингредиента, например соединение и партнер по комбинации, вводят пациенту одновременно в форме отдельного объекта или дозировки. Термин «нефиксированная комбинация» означает, что оба активных ингредиента, например соединение и партнер по комбинации, вводят пациенту в виде отдельных объектов одновременно, совместно или последовательно без конкретных временных рамок, причем такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента. Последнее также применимо к терапии с использованием смеси лекарственных средств, например введению трех или более активных ингредиентов.

При использовании в данном документе, термин «фармацевтически приемлемый» означает утвержденный регуляторным органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США, другой общепризнанной фармакопее, в дополнение к другим составам, которые являются безопасными для применения у животных, а конкретнее у людей и/или других млекопитающих.

При использовании в данном документе, термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к вспомогательному веществу, разбавителю, консерванту, солюбилизатору, эмульгатору, адьюванту и/или носителю, с которым вводят соединение(-я) деметилирования. Такие носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая нефтепродукты, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители. Антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или гидросульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза, также могут представлять собой носители. Способы получения композиций в комбинации с носителями известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления изобретения фраза «фармацевтически приемлемый носитель» предназначена для включения любого и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, изотонических и замедляющих абсорбцию агентов и тому подобного, подходящих для фармацевтического введения. Использование таких сред или агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники.

См., например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003). Кроме случаев, когда какие-либо традиционные среды или агенты несовместимы с активным соединением, предполагается такое использование в указанных композициях.

5 При использовании в данном документе, «терапевтически эффективное количество» относится к количеству фармацевтически активного соединения (соединений), которого достаточно для лечения или улучшения, или некоторым образом ослабления
10 симптомов, связанных с заболеваниями и медицинскими патологическими состояниями. При использовании по отношению к способу, способ является достаточно эффективным для лечения или улучшения или некоторым образом
ослабления симптомов, связанных с заболеваниями или патологическими состояниями. Например, эффективное количество по отношению к заболеваниям
15 представляет собой то количество, которое является достаточным для блокирования или профилактики начала; или если патология заболевания началась для временного облегчения, улучшения, стабилизации, обращения или замедления прогрессирования
заболевания или иного уменьшения патологических последствий заболевания. В любом случае эффективное количество может быть дано в одной или нескольких
дозах.

При использовании в данном документе, термины «лечить», «лечение» или «лечащий»
20 включает в себя по меньшей мере ослабление симптомов, связанных с заболеваниями у пациента, при этом ослабление используют в широком смысле для обозначения по меньшей мере снижения величины параметра, например симптома, связанного с
заболеванием или патологическим состоянием, подвергаемым лечению. Таким образом, «лечение» также включает ситуации, когда заболевание, расстройство или
25 патологическое состояние или по меньшей мере симптомы, связанные с ними, полностью ингибированы (например, устранено начало) или остановлены (например, прекращены), так что пациент больше не страдает от патологического состояния или
по меньшей мере симптомов, которые характеризуют патологическое состояние.

При использовании в данном документе и если иное не указано, термины
30 «предотвращать», «профилактический» и «профилактика» относятся к профилактике начала, рецидива или распространения заболевания или расстройства или одного или более его симптомов. В некоторых вариантах осуществления изобретения термины относятся к лечению или введению соединения или лекарственной формы,

представленной в данном документе, с одним или более другими дополнительными активными агентами или без них до начала симптомов, особенно субъектам, имеющим риск возникновения заболевания или расстройства, представленного в данном документе. Термины охватывают ингибирование или ослабление симптома конкретного заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъекты с заболеванием в семейном анамнезе являются потенциальными кандидатами режимов профилактики. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъекты с рецидивом симптомов в анамнезе также являются потенциальными кандидатами для профилактики. В этом отношении, термин «профилактика» может использоваться взаимозаменяемо с термином «профилактическое лечение».

При использовании в данном документе и если иное не указано, «профилактически эффективное количество» соединения представляет собой количество, достаточное для профилактики заболевания или расстройства или профилактики его рецидива. Профилактически эффективное количество соединения означает количество терапевтического агента, отдельно или в комбинации с одним или более другими агентами, которые обеспечивают профилактическую пользу при профилактике заболевания. Термин «профилактически эффективное количество» может охватывать количество, которое улучшает общую профилактику или усиливает профилактическую эффективность другого профилактического агента.

При использовании в данном документе, термин «терапевтический агент», «агент против VEGF», «слитой белок», «химерный белок» или «рекомбинантный белок» включает первый полипептид, функционально связанный со вторым полипептидом, при этом «терапевтический агент», «агент против VEGF», «слитой белок», «химерный белок» или «рекомбинантный белок» ингибирует активность VEGF. Химерные белки могут необязательно содержать третий, четвертый или пятый или другой полипептид, функционально связанный с первым или вторым полипептидом. Химерные белки могут содержать два или более различных полипептида. Химерные белки могут содержать несколько копий того же полипептида. Химерные белки могут также содержать одну или более мутаций в одном или более полипептидах. Способы получения химерных белков хорошо известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин «терапевтический агент», «слитой белок», «химерный белок» или «рекомбинантный белок» относится к любым конструкциям, экспрессируемым или синтезированным, включая, но не ограничиваясь

ими, пептиды или белки, функционально связывающие один или более Ig-подобных доменов или фрагментов доменов VEGFR-1 и/или VEGFR-2 с Fc-IgG.

Термин «Ig-подобные домены» относятся к Ig-подобным доменам 1-7 VEGFR-1 и VEGFR-2. Термин «фрагменты Ig-подобного домена» включает участок домена 5 полной длины, обычно связывающий гепарин и/или VEGF, или его переменный участок. Примеры фрагментов домена включают аминокислотные последовательности, содержащие сегмент, который идентичен по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, 90%, 95% и наиболее предпочтительно на 99% домену полной длины с идентичностью на 100%, и его 10 варианты. Варианты аминокислотных последовательностей слитых белков подразумеваются как охваченные данным описанием, при условии что варианты аминокислотных последовательностей сохраняют по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, 90%, 95% и наиболее предпочтительно 99%. Включены некоторые процентные доли между указанными величинами, такие как 15 идентичность последовательности на 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99%. В частности, подразумеваются консервативные аминокислотные замены. Консервативные замены представляют собой те, которые имеют место внутри семейства аминокислот, связанных боковыми цепями. Генетически кодируемые 20 аминокислоты, как правило, разделены на семейства: (1) кислые аминокислоты представляют собой аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты представляют собой лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты представляют собой аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженные полярные аминокислоты представляют собой глицин, аспарагин, 25 глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают (i) серин и треонин, которые представляют собой 30 алифатическое-гидрокси семейство; (ii) аспарагин и глутамин, которые представляют собой семейство, содержащее амид; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые представляют собой алифатическое семейство; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые представляют собой ароматическое семейство. Например, разумно ожидать, что отдельная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на 35 глутамат, треонина на серин или подобное замещение аминокислоты на структурно

родственную аминокислоту не будет иметь значительного влияния на связывание или свойства полученной молекулы, особенно если замена не включает аминокислоту в сайте остова. Приводит ли аминокислотная замена к функциональному слитому белку легко можно определить путем анализа специфической активности производного слитого белка. Фрагменты или аналоги слитых белков могут быть легко получены специалистами в данной области техники. Предпочтительные амино- и карбокси-концы фрагментов или аналогов имеются возле границ функциональных доменов.

При использовании в данном документе, «выделенный» или «очищенный» слитой белок означает, что слитой белок является основной имеющейся молекулой (т.е. на основании молей он более распространен, чем любая другая молекула в композиции), и предпочтительно практически очищенная фракция представляет собой композицию, в которой слитой белок составляет по меньшей мере около 50% (на основании молей) всех присутствующих макромолекул. В общем, очищенная композиция будет содержать более чем около 80% все макромолекул, присутствующих в композиции, более предпочтительно более чем около 85%, 90%, 95% и 99%. Более предпочтительно, слитой белок очищают до существенной гомогенности (загрязняющие молекулы невозможно обнаружить в композиции с помощью традиционных способов обнаружения), при этом композиция состоит по существу из одного вида макромолекул.

В одном аспекте в данном изобретении раскрыта композиция, содержащая терапевтический агент, при этом терапевтический агент содержит один или более доменов, связывающих гепарин, VEGFR-1 или VEGFR-2, и один или более доменов, связывающих VEGF, ингибируя таким образом связывание VEGF с его родственным рецептором. В вариантах осуществления изобретения агент против VEGF содержит участок, связывающий VEGF, функционально связанный с Fc-IgG, при этом участок, связывающий VEGF, содержит по меньшей мере один домен, связывающий VEGF, который представляет собой IgG-подобный домен 2 VEGFR-1.

В вариантах осуществления в данном изобретении предложены композиции и способы лечения связанного с VEGF офтальмологического расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту интравитреально первого терапевтически эффективного количества агента против VEGF и введение интравитреально субъекту второго терапевтически эффективного количества агента против VEGF в течение более чем 8 недель или в течение от 10 до 30 недель после более раннего введения. В вариантах осуществления изобретения второе

терапевтически эффективное количество агента против VEGF вводят интравитреально в течение от 16 до 24 недель после более раннего введения. В вариантах осуществления изобретения способ включает последовательное введение терапевтически эффективного количества агента против VEGF, вводимого интравитреально в течение от 10 до 30 недель после предшествующего введения в течение периода по меньшей мере один год. В изобретении предложены такие режимы дозирования, какие могут потребоваться для любого конкретного отдельного субъекта, нуждающегося в этом, при этом второе и последующие введения являются менее частыми, чем необходимо для эквимолярного количества афлиберцепта, вследствие большей эффективности связывания гепарина, чем афлиберцепта. В изобретении дополнительно предложено, что после внутриглазного введения уровни агентов против VEGF в плазме у индивида ниже, чем уровни афлиберцепта в плазме индивида после внутриглазного введения эквимолярного количества афлиберцепта, что устраняет нежелательные системные эффекты, такие как вредные эффекты, связанные с неврологическим развитием.

В вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество агента против VEGF составляет от около 1 до 10 мг. В вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество агента против VEGF составляет от около 3 до 6 мг. В вариантах осуществления изобретения первое, второе и последующие терапевтически эффективные количества являются одинаковыми. В вариантах осуществления изобретения первое, второе и последующие терапевтически эффективные количества являются различными. В изобретении предложены такие дозировки терапевтически эффективных количеств, которые могут потребоваться для любого конкретного агента против VEGF для любого конкретного отдельного субъекта, нуждающегося в этом.

В вариантах осуществления в данном изобретении предложен агент против VEGF, который содержит участок, связывающий VEGF, функционально связанный с Fc-IgG, при этом участок, связывающий VEGF, содержит по меньшей мере один домен, связывающий VEGF, который представляет собой IgG-подобный домен 2 VEGFR-1, и при этом агент против VEGF обладает способностью ингибировать стимулируемый VEGF митогенез, большей чем у афлиберцепта. В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что агент против VEGF обладает способностью связываться со стекловидным телом, большей чем у афлиберцепта. В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что агент против VEGF обладает способностью

ингибировать пролиферацию эндотелиальных клеток, стимулируемую VEGF, связанную со стекловидным телом, большей чем у афлиберцепта. В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что агент обладает увеличенным периодом полувыведения *in vivo* по сравнению с афлиберцептом.

5 Связывающие VEGF домены VEGFR хорошо известны в данной области техники. Иллюстративные аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот для IgG-подобных доменов V₁, V₂, V₃ и V₄ VEGFR-1 представлены на Фигурах 14-20, соответственно, что представляет полный фрагмент IgG1-Fc человека и домены VEGFR-1, как описано. Аминокислотные

10 последовательности для отдельных IgG-подобных доменов человека V₁, V₂, V₃ и V₄ VEGFR-1 также отдельно представлены в SEQ ID №: 15-18, соответственно. Аминокислотная последовательность V₁ представляет собой SEQ ID №: 15 (аминокислотная последовательность, выделенная желтым на Фиг. 14, которая представлена в рамках SEQ ID №: 1). Аминокислотная последовательность V₂

15 представляет собой SEQ ID №: 16 (аминокислотная последовательность, выделенная синим на Фиг. 14, которая представлена в рамках SEQ ID №: 1). Аминокислотная последовательность V₃ представляет собой SEQ ID №: 17 (аминокислотная последовательность, выделенная серым на Фиг. 14, которая представлена в рамках SEQ ID №: 1). Аминокислотная последовательность V₄ представляет собой SEQ ID №:

20 18 (аминокислотная последовательность, выделенная зеленым на Фиг. 18, которая представлена в рамках SEQ ID №: 9)

В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что участок, связывающий VEGF, состоит по существу из IgG-подобных доменов 1, 2 и 3 VEGFR-1 (V₁₋₂₋₃). В вариантах осуществления изобретения агент против VEGF содержит

25 аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID №: 1.

В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что участок, связывающий VEGF, состоит по существу из IgG-подобных доменов 2 и 3 VEGFR-1 (V₂₋₃). В вариантах осуществления изобретения агент против VEGF содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID №: 3.

30 В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что участок, связывающий VEGF, состоит по существу из IgG-подобных доменов 1, 2, 3 и 3 VEGFR-1 (V₁₋₂₋₃₋₃). В вариантах осуществления изобретения агент против VEGF содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID №: 5.

В вариантах осуществления в данном изобретении предложено, что участок, связывающий VEGF, состоит по существу из IgG-подобных доменов 2, 3 и 3 VEGFR-1 (V₂₋₃₋₃). В вариантах осуществления изобретения агент против VEGF содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID №: 7.

5 В вариантах осуществления в изобретении представлена фармацевтическая композиция для применения в лечении связанного с VEGF офтальмологического расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, при этом агент против VEGF является таким, как представлено в данном документе. В вариантах осуществления в данном изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически
10 эффективное количество агента против VEGF, как определено в формуле изобретения, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы лечения VEGF-связанного расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества агента против VEGF, как определено. Агент
15 против VEGF можно непосредственно вводить в поражаемую ткань или орган, такой как глаз.

В вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ лечения глазного заболевания, при этом агент против VEGF вводят интравитреально более чем один раз каждые 16 недель. В вариантах осуществления изобретения агент против VEGF вводят
20 интравитреально более чем один раз каждые 16-24 недели. В вариантах осуществления изобретения лечение продолжают в течение периода, составляющего по меньшей мере один год. В вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество агента против VEGF составляет от около 1 до 10 мг. В вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество агента против
25 VEGF составляет от около 3 до 6 мг.

В вариантах осуществления изобретение можно применять для лечения широкого набора связанных с VEGF расстройств, в том числе неоваскулярной возрастной макулярной дистрофии, хориоидальной неоваскуляризации на фоне близорукости, пролиферативной диабетической ретинопатии, диабетического отека желтого пятна,
30 обструкции сосудов сетчатки, такой как окклюзия вены сетчатки, глазных опухолей, синдрома фон Гиппеля-Линдау, ретинопатии недоношенных, полиповидной хориоидальной васкулопатии или расстройств, не относящихся к новообразованиям, которые получают пользу от терапии против VEGF.

В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтический агент представлен в вводимой лекарственной форме, содержащей терапевтический агент и дополнительное вспомогательное вещество, носитель, адъювант, растворитель или разбавитель.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения в данном изобретении раскрыта фармацевтическая композиция, пригодная для лечения и/или профилактического лечения субъекта, при этом агент против VEGF содержится в количестве, эффективном для достижения предназначенной цели.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтический агент или композиции, раскрытые в данном документе, вводят путем инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции или терапевтический агент вводят непосредственно в пораженный орган или ткань. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтический агент можно местно вводить, например, с помощью пластыря или непосредственного нанесения на пораженный орган или

15 ткань или с помощью ионтофореза. Терапевтические агенты могут быть представлены в композициях с замедленным высвобождением, такие как описанные, например, в патентах США № 5672659 и 5595760. Использование композиций с быстрым или замедленным высвобождением зависит от характера патологического состояния, которое лечат. Если патологическое состояние включает острое или сверхострое

20 расстройство, предпочтительным будет лечение с использованием формы с быстрым высвобождением вместо композиции с пролонгированным высвобождением. Альтернативно, для определенного профилактического или длительного лечения могут подходить композиции с замедленным высвобождением.

Агент против VEGF также может быть доставлен с использованием имплантата, такого как, но не ограничиваясь этим, внутриглазной имплантат. Такие имплантаты

25 могут быть биodeградируемыми и/или биосовместимыми имплантатами или могут не быть биodeградируемыми имплантатами. Имплантаты могут быть проницаемыми или непроницаемыми для активного агента. Конкретные имплантаты для доставки терапевтического агента зависят от пораженной ткани или органа, а также от природы

30 патологического состояния, подвергаемого лечению. Применение таких имплантатов хорошо известно в данной области техники.

Агент против VEGF, описанный в этом изобретении, может быть представлен в виде наночастиц или других составов лекарственного средства, чтобы обеспечить точную

доставку в конкретные ткани, а также обеспечивать терапию с контролируемым высвобождением.

Агент против VEGF, описанный в этой заявке, может быть доставлен не только в виде очищенных рекомбинантных белков, но также как подход генной терапии. Для доставки ингибитора VEGF с помощью субретинальной или интравитреальной доставки можно применять рекомбинантные адено-ассоциированные вектора (rAAVs) или другие пригодные вектора^{43,44}.

В связанном аспекте в изобретении предложен способ лечения связанного с VEGF или неоваскулярного расстройства у субъекта, при этом способ включает введение субъекту: (а) эффективного количества слитого белка, способного связывать гепарин и уменьшать или предотвращать развитие нежелательных новых сосудов. Слитой белок может быть объединен с другими агентами против VEGF, включая, но не ограничиваясь этим, антитела или фрагменты антител, специфичные к VEGF; антитела, специфичные к рецепторам VEGF; соединения, которые ингибируют, регулируют и/или модулируют трансдукцию сигнала тирозинкиназой; полипептиды VEGF; олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию VEGF на уровне нуклеиновой кислоты, например антисмысловых РНК; и различные органические соединения и другие агенты с активностью ингибирования ангиогенеза.

В изобретении предложено, что связывающий гепарин, опосредованный D3 (или другим Ig-подобным доменом) VEGFR1²⁸, хотя и не подходит для системного введения, может давать важные преимущества для интравитреального (или другого местного) введения. Действительно, способность связываться с HGPSG, ключевым компонентом внеклеточного матрикса²⁹, способствует накоплению в стекловидном теле, а также проникновению в сетчатку³⁰. В изобретении предложен ряд конструкций слияния с Fc VEGFR-1, имеющих различные способности взаимодействовать с HSPG. Это дает возможность выбора ингибиторов VEGF, различных с точки зрения длительности/периода полувыведения, которые являются пригодными в различных клинических условиях.

Указанные признаки и другие детали изобретения сейчас будут более конкретно описаны и указаны в следующих примерах, описывающих предпочтительные методики и экспериментальные результаты. Указанные примеры представлены с целью иллюстрации изобретения и не должны рассматриваться ограничивающими.

ПРИМЕРЫ

Для идентификации более эффективных и длительных ингибиторов VEGF для внутриглазного применения изучали различные варианты связывания с гепарином в D VEGFR1. В связи с этим было разработано восемь конструкций слияния VEGFR1-Fc, имеющих различное связывание с гепарином, обеспечивая таким образом спектр аффинности к HSPG. Фиг. 1 иллюстрирует доменную структуру этого белка и выделяет гепарин-связывающие домены. Все белки включают D2, ключевую детерминанту лигандной специфичности²⁷. Две конструкции (V1233 и V233) имеют дублированный D3. Также представлена структура домена афлиберцепта.

В изначальных экспериментах уровни экспрессии нескольких из конструкций были низкими; V1234, V1233, V234 и V124 были обнаружимыми при низких уровнях в кондиционированной среде. Интересно, более ранние исследования продемонстрировали, что изоформы VEGF с высокой аффинностью к гепарину (VEGF189 или VEGF206) являются практически недетектируемыми в кондиционированной среде трансфицированных клеток, связываясь главным образом с клеточной поверхностью или внеклеточной матрицей^{38 9}. Однако они могут быть высвобождены в растворимой форме путем добавления гепарина или гепариназы, указывая на то, что сайт связывания состоял из HSPG^{38 9}. Таким образом определяли, может ли добавление гепарина также влиять на уровни рекомбинантных слитых белков VEGFR-1. Действительно, добавление гепарина к среде трансфицированных клеток привело к дозозависимому повышению концентраций рекомбинантного белка в среде (данные не показаны).

Была предпринята попытка очищать рекомбинантные белки просто с помощью традиционной эксклюзионной хроматографии с использованием белка А (РА). Однако этот способ давал основную полосу ожидаемой массы и большое количество второстепенных полос, вероятно отражая взаимодействие сильно основных, связывающих гепарин, рекомбинантных белков с HSPG, полученными из клеток-хозяев, и другими анионными молекулами. Поэтому был разработан протокол, который устраняет такие примеси, как описано в способах. Промывка при высоком рН (9,2) в присутствии 1,2 М NaCl, когда белок связан с РА, приводила к высвобождению различных загрязняющих веществ. Следующая стадия, анионообменная хроматография, была очень эффективной для удаления основной массы загрязняющих веществ и агрегатов, тогда как очищенный белок был в элюате. Уровни LPS в готовых очищенных препаратах были < 0,1 МЕ/мг (диапазон 0,02-0,08), что является очень низким уровнем, соответствующим доклиническим исследованиям³⁹. Как показано на

Фиг. 2А, чистота рекомбинантных белков была >95%, как оценено с помощью окрашенного серебром ДСН/PAGE, и была подобной чистоте лекарственного препарата EYLEA, утвержденного FDA. Фиг. 2В демонстрирует аналитические профили SEC трех наиболее перспективных кандидатов V23, V1233 и V233 наряду с EYLEA. Подобно EYLEA указанные три белка элюировались в виде одного пика при ожидаемом времени удерживания без значительной агрегации.

Рекомбинантные белки были протестированы относительно их способности ингибировать митогенез, вызванный VEGF₁₆₅ (10 нг/мл) в BCEC. Как проиллюстрировано на фигуре, они обладали ингибирующими эффектами, при этом величины IC₅₀ были в диапазоне ~1 нМ за исключением V124 и V24, которые были менее активными (Фиг. 3). Мы также задокументировали их способность ингибировать митогенез BCEC, стимулированный VEGF₁₂₁ (Фиг. 7). Интересно, EYLEA практически во всех осуществленных экспериментах (>10) был сильнодействующим, являясь активным при низких концентрациях, с IC₅₀, составляющей ~1 нМ, но ингибировал не более ~80% стимулированной VEGF пролиферации даже при наивысших исследованных концентрациях. Подобные результаты были получены с использованием анализов пролиферации HUVEC (Фиг. 8). Напротив, конструкции VEGFR1 (за исключением V124 и V24) полностью блокировали индуцированную VEGF пролиферацию. Способность детектировать такие различия вероятно отражает относительно широкий динамический диапазон нашего анализа пролиферации BCEC в ответ на стимуляцию VEGF (~4-кратное увеличение). D3 VEGFR1 может обеспечивать улучшенную интерактивную поверхность по сравнению с D3 из VEGFR2, особенно учитывая что VEGFR1 связывает VEGF значительно более эффективно, чем VEGFR2^{40 41}. Для тестирования этой гипотезы осуществляли сравнение файлов базы данных белковых структур комплекса VEGFR1/VEGF (5T89)³⁰ и комплекса VEGFR2/VEGF (3V2A)⁴² и совмещенных D2-D3 из каждого рецептора. Этот анализ поддерживает указанную гипотезу. Например, Arg280 в VEGFR1-D3 взаимодействует с боковой цепью Phe36 VEGF, тогда как VEGFR2 содержит там Asp. Подобно, в VEGFR1 обе Arg261 и Asn290 взаимодействуют с Glu64 VEGF; в VEGFR2 Arg261 замещен на Gly, а следовательно в VEGFR2 только Lys, заменяющий Asn290, может взаимодействовать с Glu64 VEGF. Фиг. 9 иллюстрирует остатки VEGFR1, которые могут потенциально взаимодействовать с VEGF и которые отличаются у VEGFR1 и VEGFR2.

Для того чтобы дополнительно определить терапевтически важные взаимодействия, оценивали, связываются ли рекомбинантные белки со стекловидным телом быка *in vitro*. Как проиллюстрировано на Фиг. 4, когда EYLEA, контрольный IgG или бевацизумаб обладают слабым связыванием, или оно отсутствует, наши белки демонстрировали значительное связывание. Наиболее сильными связывающими агентами были V1233, V233 и V1234, за которыми следует V123. V23 обладал промежуточными характеристиками связывания между EYLEA (или контрольным IgG) и V1233. Связывание со стекловидным телом вытеснялось гепарином дозозависимым образом.

Рекомбинантные белки тестировали на мышинной модели CNV и сравнивали с контрольным IgG или EYLEA. Обширный литературный обзор подтверждает способность агентов против VEGF подавлять неоваскуляризацию в этой модели^{43 44 45}. Относительно низкие дозы были выбраны для исследований с целью подтверждения правильности концепции, наиболее подходящих для выявления различий в активности и устойчивости среди различных белков. Также сообщалось, что интравитреальное введение высоких доз антител изотипа IgG1 может обладать нецелевыми ангиоингибирующими эффектами, опосредованными передачей сигнала Fc посредством FcγRI и c-Cbl, приводящей к нарушенной миграции макрофагов⁴⁶. Эти эффекты потенциально могут исказить интерпретацию данных. Применяемые дозы являются эффективными и в то же время должны устранять такие нецелевые эффекты. Исходно, каждый белок вводили интравитреально в дозе 2,5 мкг за один день до лазерного лечения. EYLEA также тестировали при 25 мкг. Как проиллюстрировано на Фиг. 5A, EYLEA приводила к ингибированию приблизительно на 30% в дозе 2,5 мкг и ингибированию ~ 50% в дозе 25 мкг. Эти данные хорошо соотносятся с опубликованными в литературе. Например, Saishin et al. сообщал, что интравитреальная инъекция ~5 мкг афлиберцепта приводила к ингибированию на ~30% области CNV у мыши⁴⁴. Действительно, обычно используют дозу 40 мкг для достижения максимальных ингибирующих эффектов афлиберцепта в мышинной модели CNV⁴⁷.

Неожиданной была большая активность некоторых из конструкций: V123, V23, V1233 и V233. Введение 2,5 мкг этих белков за один день до повреждения совпадало или даже превышало уровень ингибирования, достигаемый с использованием 25 мкг EYLEA. Однако ни одна из конструкций, которая включала D4, не демонстрировала значительного ингибирования CNV (Фиг. 5A).

Для определения может ли связывание с гепарином преобразовываться в длительные терапевтические эффекты после однократного введения, V1233, EYLEA или контрольный IgG вводили интравитреально (2,5 мкг) за 1 день, 7 дней или 14 дней до повреждения, индуцированного лазером. Как показано на Фиг. 5B, EYLEA приводила к значительному ингибированию только при введении за 1 день до повреждения. Напротив, V1233 приводило к значительному ингибированию, также при введении за 7 дней или 14 дней до повреждения.

В последующем исследовании эквимоллярные количества EYLEA, V23, V1233 и V233 (4,8 мкг EYLEA и V23, 6,3 мкг V233 и 7,2 мкг V1233) вводили за 14 дней до повреждения. Фиг. 5C иллюстрирует, что в исследуемой дозе EYLEA обладал очень незначительным влиянием на CNV. Напротив, V23, V1233 и V233 приводили к значительному ингибированию CNV. Предсказание гипотезы заключается в том, что ингибиторы с сильными гепарин-связывающими характеристиками будут обладать более низким систематическим воздействием по сравнению с EYLEA. В оба глаза интравитреально вводили эквимоллярные количества EYLEA, V23, V233 или V1233, и измеряли уровни Fc человека в сыворотке в различные моменты времени до 21 дня после интравитреального введения, как показано на Фиг. 5D. Введение EYLEA приводило к наиболее высоким уровням в сыворотке в течение эксперимента. V23, который обладал единственным гепарин-связывающим доменом, приводил к более низким уровням в сыворотке, чем EYLEA, но имел тенденцию к более высоким уровням, чем V1233 или V233.

Наконец, мы сравнивали несколько доз V1233 и EYLEA в модели OIR. В соответствии с данными в модели CNV, V1233 был более сильнодействующим, чем EYLEA в ингибировании неоваскуляризации (Фиг. 6).

Фигура 7 демонстрирует ингибирующие эффекты слитого белка на пролиферацию VSEC, стимулируемую VEGF165 или VEGF121. Результаты выражены в % ингибирования стимулированной VEGF пролиферации относительно контроля. Количество клеток определяли по относительным единицам флуоресценции (RFU) 530/590 (возбуждение/эмиссия), среднее трех параллельных.

Фигура 8 иллюстрирует ингибирующие эффекты рекомбинантных белков слияния рецептора VEGF и Fc на пролиферацию HUVEC. V123, V1233, V233, V23 или EYLEA (10-2000 нг/мл) добавляли вместе с VEGF165 (10 нг/мл) в течение 3 дней, и определяли жизнеспособность клеток. Результаты выражены в % ингибирования стимулированной

VEGF пролиферации относительно контроля. Количества клеток определяли по относительным единицам флуоресценции (RFU) 530/590 (возбуждение/эмиссия), среднее трех параллельных. Статистический анализ выполняли с помощью 2-факторного ANOVA с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. 5
Статистическая значимость * $p < 0,001$, ** $p < 0,0001$ была рассчитана путем сравнения только с VEGF.

Фигура 9 иллюстрирует, что кристаллическая структура комплекса VEGF/VEGFR2 (3V2A) была наложена на кристаллическую структуру комплекса VEGF/VEGFR1 (5T89). Отмечены остатки VEGFR1, которые могут потенциально взаимодействовать с VEGF и которые отличаются у VEGFR1 и VEGFR2. Отмечено желтым и синим: VEGF. 10
Отмечено зеленым: D2 VEGFR1. Белым: D3 VEGFR1. Анализ указывает на более сильное взаимодействие между VEGF и D3 VEGFR1 по сравнению с D3 VEGFR2.

Активность очищенного, экспрессируемого CHO V1233 проверяли в двух независимых биоанализах: пролиферация BCEC (Фиг. 10) и биоанализы VEGF 15
Promega (Фиг. 11). Оба анализа демонстрируют, что две независимые партии очищенного V1233 ингибируют стимулируемый VEGF рост или активацию рецептора с подобной (если не большей) активностью, как и EYLEA.

Также было определено что в отличие от клеток 293 (система Expi-293) в клетках CHO экспрессия конструкций не зависит от добавления гепарина в среду (Фиг. 12), что 20
является значительным преимуществом. Дополнительно, мы определяли, что полученный из CHO V1233 является полностью активным в мышинной модели CNV и не менее активным, чем V1233, экспрессируемый 293 (Фиг. 13).

Обсуждение

Взаимодействие D3 с HPSG долгое время считали ограничением подходов против VEGF на основе VEGFR1 вследствие изоляции в различных тканях, что приводит к 25
сниженному системному периоду полувыведения. Для опровержения этого вопроса Holash et al. заменили D3 VEGFR1 на D3 VEGFR2²¹. С той же целью Lee et al. не так давно ввели сайт гликозилирования в D3 VEGFR1, эффективно нейтрализующий положительные заряды и таким образом устраняющий D3-опосредованное связывание 30
с HSPG⁴⁸. В обоих случаях системный период полувыведения повышался относительно исходной конструкции VEGFR1^{21 48}.

В данном исследовании разработан ряд конструкций слияния с Fc VEGFR-1, имеющих различные способности взаимодействовать с HSPG. Предпосылка заключалась в том, что связывающий гепарин, опосредованный D3 VEGFR1 (или другой Ig-подобный D, такой как D4⁴⁹), хотя обладает недостатками для системного лечения, может давать уникальные преимущества ингибитору VEGF, используемому для интравитреального введения, поскольку а) он должен прикреплять ингибиторы к HSPG или другим анионным молекулам в стекловидном теле или другой структуре в глазу, таким образом увеличивая его период полувыведения; б) нет необходимости, чтобы такой ингибитор был равномерно распределен или глубоко проникал в структуры глаза, чтобы эффективно связывать и блокировать VEGF. Различные исследования показали, что VEGF может диффундировать на значительное расстояние от его места продуцирования в ответ на биохимические градиенты, определенные с помощью HSPG или распределения рецепторов в сосудистой системе или других сайтах^{50 8 9}. Например, хотя VEGF продуцируется опухолевыми клетками даже на значительном расстоянии от сосудистой системы, он диффундирует и накапливается в кровеносных сосудах за счет его высокой аффинности к рецепторам VEGF⁵¹⁻⁵³. Следовательно, ожидается что связанные со стекловидным телом варианты VEGFR1 создадут сильные градиенты, способные притягивать и нейтрализовать VEGF.

Учитывая проблемы при осуществлении точных измерений аффинности с использованием сенсорных платформ, таких как SPR с очень жесткими связующими агентами ($K_d < 100$ пм)⁵⁴, несогласующиеся данные относительно аффинности афлиберцепта по отношению к другим ингибиторам VEGF^{21 55} и плохую корреляцию между аффинностью связывания и терапевтической активностью/эффективностью среди нейтрализующих антител к VEGF и другим мишеням^{56 57}, в этом исследовании было решено сфокусироваться на биологических данных IC_{50} , которые являются более физиологически значимыми. Как проиллюстрировано на Фиг. 4, рекомбинантные белки обладали ингибирующими эффектами, при этом величины IC_{50} были в диапазоне ~1 нМ за исключением V124 и V24, которые были значительно менее активными.

Эти белки связываются со стекловидным телом быка. Наиболее сильными связывающими агентами были V1233, V1234, за которыми следует V123. V23 обладал значительным, но более низким связыванием со стекловидным телом. Напротив, контрольный IgG, EYLEA (эйлеа) или AVASTIN (авастин) обладали минимальным связыванием.

Неожиданным открытием нашего исследования было большая активность некоторых из конструкций: V123, V23, V1233 и V233. Введение 2,5 мкг этих конструкций за один день до повреждения совпадало или даже превышало уровень ингибирования, достигаемый с использованием 25 мкг EYLEA. Тот факт, что V1233, но не EYLEA, обладает значительным эффектом при предотвращении CNV, когда его вводят за 7 дней или 14 дней до повреждения, фиксирует длительность эффектов и терапевтическую ценность.

Также было установлено, что интравитреальная инъекция указанных белков, связывающих гепарин, приводит к значительно более низким системным уровням, чем EYLEA. Это свойство может быть особенно полезным, например, для лечения ROP, поскольку сообщалось, что лечение агентами против VEGF со значительным системным воздействием может обладать пагубными эффектами, связанными с неврологическим развитием^{58 59}.

Интересно, ни одна из конструкций, содержащая D4 (V1234, V234, V124, V24), не приводила к значительному ингибированию *in vivo* (при по меньшей мере исследуемой дозе) несмотря на тот факт, что эти молекулы (за исключением V_{2,4}) демонстрировали способность ингибировать митогенез, стимулируемый VEGF, *in vitro*. Однако, все эти конструкции продемонстрировали склонность образовывать олигомеры или агрегаты, как оценено с помощью ДСН/PAGE в невосстанавливающих условиях и эксклюзионной хроматографии (данные не показаны). Хотя более ранняя работа⁶⁰ идентифицировала D4 (вместе с D7), как требование для димеризации VEGFR-1, такой эффект известен как зависимый от лиганда. Исследования кристаллической структуры показали петлю в D4, ответственную за такие гомотипные взаимодействия³⁰. Понятно, что высокие концентрации и/или вынужденная димеризация за счет конструкции Fc может приводить к независимым от лиганда взаимодействиям, приводящим к агрегации. В любом случае агрегаты не являются желаемыми фармацевтическими препаратами, принимая во внимание возможность воспаления и иммуногенности^{61, 62}. Важно, что отсутствие значительной эффективности наших белков, содержащих D4, опровергает возможность того, что примесь может отвечать за наблюдаемую эффективность, поскольку все белки были очищены с помощью той же методологии и обладают сильными гепарин-связывающими свойствами.

В заключение афлиберцепт был разработан для устранения гепарин-связывающего домена гепарина, чтобы улучшить системный период полувыведения для

онкологических симптомов. Напротив, конструкции, описанные в данном исследовании, разработаны для стимулирования связывания и удерживания в стекловидном теле для обеспечения более длительных и терапевтически значимых взаимодействий.

5 В экспериментах, в которых клетки CHO, применяли как экспрессионную систему, требование добавлять гепарин к среде трансфицированных клеток было значительно снижено, так что добавление гепарина к среде приводило к очень небольшим возрастаниям концентраций рекомбинантных белков. Это вероятно объясняется различиями в композиции/концентрациях HSPG между клетками 293 и CHO.

10 **Методы**

Для построения экспрессионных плазмид VEGFR-Fc фрагменты нуклеиновых кислот, кодирующие сигнальный пептид, и комбинацию внеклеточных Ig-подобных доменов один-четыре VEGRF127 (ID гена: 2321) синтезировали в GenScript USA Inc. Были созданы следующие конструкции: D1, D2 и D3 V123; D2 и D3 V23; D1, D2, D3 и D3 V1233; D2, D3 и D3 V233; D1, D2, D3 и D4 V1234; D2, D3 и D4 V234; D1, D2 и D4 V124; D2 и D4 V24. Синтезированные фрагменты были вставлены в вектор pFUSE-hIgG1-Fc1 (InvivoGen, #pfuse-hg1fc1) в сайты EcoRI и BgIII, давая плазмиды, содержащие различные ECD VEGFR1. Затем с использованием основного набора для мутагенеза PrimeSTAR (Takara, R046A), промежуточные аминокислоты R и S (сайт BgIII) между ECD и фрагментом Fc удаляли, получая плазмиды, экспрессирующие слитые белки ECD VEGFR1 с IgG1-Fc человека из 227 аминокислот.

Трансфекция и подготовка кондиционированной среды

Экспрессионную систему Expi293 (Life technologies, A14524) использовали для получения кондиционированной среды для очистки в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки Expi293FTM (ThermoFisher) культивировали в суспензии в среде для экспрессии Expi293TM при 37°C в увлажненной атмосфере с 8% CO₂. Когда плотность клеток достигла 2,5 миллиона/мл, смешивали плазмидные ДНК и реагент ExpiFectamineTM 293, инкубировали 5 мин. и добавляли к клеткам. Конечная концентрация ДНК и трансфицированного реагента составляла 1 мкг и 2,7 мкл на миллилитр, соответственно. Через пять часов после трансфекции к клеткам добавляли 100 мкг/мл гепарина (Sigma, H3149) и смесь для ингибирования протеазы, 1:400 (Sigma, P1860). Через 16 часов после трансфекции добавляли энхансерные реагенты 1 и 2. Через девять часов после трансфекции собирали кондиционированную среду. В аликвотах определяли концентрации белков слияния с Fc с использованием

набора ELISA для Fc человека (Syd Labs, EK000095-HUFC-2) в соответствии с инструкциями производителя. Добавляли ингибиторы протеазы (1:500) к основному объему, который хранили при -80оС до последующего применения.

Очистка рекомбинантных белков

5 Применяли реагенты, свободные от пирогена. Перед использованием колонки и оборудование (Akta Explorer System) дезинфицировали путем воздействия 0,5 н. NaOH. Кондиционированную среду из трансфицированных клеток доводили с помощью ФСБ, 0,01% полисорбата (PS) 20. PS20 добавляли к буферам на всех
10 стадиях. После центрифугирования при 20000xg в течение 30 минут супернатанты подвергали эксклюзионной хроматографии с белком А (РА) с использованием Hi-Trap MabSelect SuRe (5 мл, GE Healthcare). После загрузки колонку промывали с использованием 20 mM диэтанолamina, pH 9,2, 1,2 М NaCl, до элюирования с помощью 0,1 М лимонной кислоты, pH 3,0, которую сразу же нейтрализовали. Набор РА после элюирования затем разбавляли в 20 mM диэтанолamine, pH 9,2, и применяли
15 анионообменную колонку Hi-Trap Q (GE Healthcare). Связанный материал элюировали градиентом NaCl. Элюат, который содержал очищенный рекомбинантный белок, сразу же доводили до 20 mM Трис, pH 6,8, а затем концентрировали посредством связывания с гепарином-сефарозой (Hi-TrapTM-HS). После промывания с помощью 0,2-0,45 М NaCl (в зависимости от конструкции) рекомбинантный слитой белок VEGFR1
20 элюировали с помощью 1 М NaCl. Конечная стадия очистки состояла из эксклюзионной хроматографии (SEC). Наконец, в белках заменяли буфер посредством диализа в 10 mM Трис, pH 6,8, 10 mM гистидина, 5-7% трегалозы, 40 mM NaCl, 0,01% PS20. Целью является получить близкий к изоосмолярному состав (~300 мОсм). Для определения уровней эндотоксина использовали набор анализа эндотоксина
25 ToxinSensor Chromogenic LAL (GenScript, L00350) в соответствии с протоколом производителя.

Анализы пролиферации клеток

Анализы пролиферации эндотелиальных клеток выполняли по существу так, как описано ранее ⁶³ ⁶⁴. Первичные хориоидальные эндотелиальные клетки быка (BCEC)
30 (пассаж <10) (VEC Technologies Rensselaer, Нью-Йорк, № в каталоге BCME-4) трипсинизировали, ресуспендировали и высевали в 96-луночные планшеты (без покрытия) в DMEM с низким содержанием глюкозы, дополненной 10% сыворотки теленка, 2 mM глутамина и антибиотиками, при плотности 1000 клеток на лунку в объеме 200 мкл. Добавляли rhVEGF₁₆₅ (R& D Systems, № в каталоге 293-VE-010) или

rhVEGF₁₂₁ (R& D Systems, № в каталоге 4644-VS010) в концентрации 10 нг/мл. Афлиберцепт (EYLEA) приобретали в аптеке. Ингибиторы добавляли к клеткам при различных концентрациях, как указано на фигурах, до добавления лигандов. Через 5 или 6 дней клетки инкубировали с использованием аламарового синего в течение 4 ч. Флуоресценцию измеряли при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны испускания 590 нм.

Первичные эндотелиальные клетки пуповинной вены человека (HUVEC) от объединенных доноров (Lonza, № в каталоге C2519A), пассаж 5-9, культивировали на пластинках, покрытых 0,1% желатина, в среде для роста эндотелиальных клеток EGM-2 (Lonza). Клетки выдерживали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Для измерения клеточной пролиферации 1800 HUVEC, суспендированных в 200 мкл основной среды для роста эндотелиальных клеток EBM-2 (Lonza), содержащей 0,5% ФБС, высевали в 96-луночный планшет. Через четыре часа к клеткам добавляли рекомбинантные Fc-слитые белки и EYLEA в концентрациях 10, 20, 50, 250, 500, 1000 и 2000 нг/мл вместе с 10 нг/мл VEGF165. Клетки культивировали в течение 3 дней и определяли жизнеспособность клеток с помощью реагента для установления жизнеспособности клеток аламарового синего (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя.

***In vitro* связывание со стекловидным телом быка**

Образцы стекловидного тела быка (InVision BioResource, Сиэтл, Вашингтон) оттаивали при 4°C, а затем разбавляли 1:1 с использованием ФБС, фильтровали через фильтр 0,22 мкм, делили на аликвоты и хранили при -80°C. Концентрации общего белка измеряли с помощью анализа белка Pierce BCA. 96-Луночный планшет EIA/RIA Stripwell Costar покрывали стекловидным телом (1 пг/лунка) в течение 4 ч при к.т. с последующим однократным промыванием ФБС-0,1% Твин 20 (ФБС-Т). В каждую лунку в объеме 50 мкл добавляли от 0,08 до 10 нМ химерного белка рецептора VEGF и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты затем промывали с помощью ФБС-Т и инкубировали с AP-конъюгированным антителом козы к Fc человека (1:2000, Invitrogen, #A18832) в течение 1 ч при к.т. Планшеты промывали с помощью ФБС-Т до 1 стадии субстрата PNPP (Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс, #37621) в течение 15-30 мин. при к.т. Поглощение будут измерять при 405 нм. S

Индукцированная лазером хориоидальная неоваскуляризация (CNV)

Самцам мышей C57BL/6J (6-8 недель) давали анестезию с использованием смеси кетамина/ксилазина до лазерного лечения. Поражения CNV были вызваны лазерной

фотокоагуляцией с использованием диодного лазера (IRIDEX, Oculight GL) и щелевой лампы (Zeiss) с размером пятна 50 мкм, мощностью 180 мВт и длительностью воздействия 100 мс.^{47, 65} Четыре лазерных ожога, как правило, вызывали в положениях 3, 6, 9 и 12 часов вокруг оптического диска в каждом глазу. Различные конструкции или контроль изотипа IgG инъецировали интравитреально в дозе 2,5 мкг на глаз в объеме 1 пл. EYLEA использовали в качестве положительного контроля при 2,5 или 25 мкг. Через один день после инъекции проводили лазерное лечение и глаза извлекали и фиксировали в 4% параформальдегиде (ПФА) в течение 15 мин, через 7 дней после лазерного лечения. В отдельном наборе исследований выбранные конструкции инъецировали однократно за 1 день, 7 дней или 14 дней до лазерного лечения. Комплексы хориоидея-склера и сетчатки отделяли и выполняли иммунофлуоресценцию (ИФ) к CD31, чтобы показать сосудистую оболочку путем окрашивания тотального препарата как тканей сетчатки, так и хориоидеи. Для CD31 ИФ антитело крысы к антителам мыши BD 550274 разбавляли 1:100 и инкубировали в течение ночи при 4°C. После 4-часовой инкубации со вторичными антителами к антителам крысы (Life Technologies A11006), тотальные препараты снимали при 488 нм. Количественное определение неоваскуляризации в пораженной области и плотность сосудов в сетчатке проводили с помощью величин Image J. Р-величины оценивали с помощью t-теста Стьюдента (значимое изменение, $p < 0,05$).

Индукцированная кислородом модель ретинопатии

Мышиная модель индуцированной кислородом ретинопатии (OIR) представляет собой хорошо установленный способ, который доказал свою эффективность в установлении молекулярных изменений при ишемическом заболевании сосудов глаза^{66 67}. С использованием закрытой камеры новорожденных мышей подвергают воздействию 75% кислорода от дня после рождения P7 до P12, а затем возвращают к 21% кислорода (воздух комнаты). Такое воздействие повышенным содержанием кислорода вызывает регрессию сосудов в центральной зоне сетчатки и прекращение нормального радиального роста сосудов, имитируя сосудо-облитерирующую фазу ишемических васкулопатий. При возвращении к воздуху комнаты бессосудистые области сетчатки становятся гипоксическими^{68 69}. Такая гипоксия вызывает экспрессию ангиогенных факторов, особенно VEGF70, что приводит к росту новых сосудов сетчатки с нарушениями в соединениях сосудистой и бессосудистой сетчатки. Для того чтобы протестировать эффекты ингибиторов, интравитреальные инъекции будут выполнены до воздействия повышенным содержанием кислорода в попытке протестировать ингибирование неоваскулярной фазы. Мышам C57BL/6j дикого типа в P7 дадут

анестезию с использованием изофлурана, протекающего через маску для ингаляции для грызунов. Веки откроют с использованием ножниц для микрохирургии по Ваннасу и оттянут назад для обследования глаза. Затем 0,5 пл раствора будут инъецировать с использованием вытянутых стеклянных микропипеток, присоединенных к системе Picospritzer III (Parker Hannifin), в полость стекловидного тела. Игла будет находиться в левой части глаза в течение 30 секунд после инъекции и будет медленно извлечена для минимизации утечки. Эту процедуру будут повторять в другом глазу, инъецируя эквивалентное количество IgG1 человека в качестве контроля (Bio X Cell, Вест-Лебанон, Нью-Гемпшир). EYLEA, различные конструкции будут протестированы относительно контрольного IgG1 в различных дозах. Веки покрывали мазью с антибиотиком. Животных из одного помета затем поместят в камеру с повышенным содержанием кислорода 75% от P7 до P12 для получения фенотипа OIR. В P17 максимальное время неоваскуляризации животных умерщвляли, и глаза извлекали, рассекали, а сосуды окрашивали с помощью BSL-FITC. Сетчатки помещали на плоскую поверхность и исследовали с помощью софокусной микроскопии. Степень неоваскуляризации количественно определяли путем измерения объема сосудистых зародышей сетчатки^{67 70-72}. Вазо-облитерацию и неоваскуляризацию анализировали с использованием автоматического программного обеспечения, как описано⁷³.

Исследования клеток СНО

20 Строение плазмид и их экспрессия

Фрагменты нуклеиновых кислот, кодирующие внеклеточные Ig-подобные домены (ECD) один-три с сигнальным пептидом VEGFR1 (ID гена: 2321) и домены Fc IgG1 человека (ID гена: 3500) синтезировали в GenScript USA Inc. Фрагменты вставляли в двойной pD2535nt-HDP EF1a-промотор вектор (ATUM) в сайтах XbaI и ECoR1, образуя плазмиды, экспрессирующие слитые белки ECD VEGFR1 с IgG1-Fc человека из 227 аминокислот. Конструкции ECD VEGFR1 были следующими: V123 содержит ECD1, 2 и 3; V1233 содержит ECD1, 2, 3 и 3; V233 содержит ECD 2, 3 и 3, и V23 содержит ECD 2 и 3. Достоверность всех конструкций проверяли анализом секвенирования.

30 Нуль-клетки СНО K1 с глутаминсинтетазой (GS) (HD-BIOP3, Horizon) использовали для стабильной экспрессии, а трансфекцию проводили с использованием системы трансфекции Neon™ (#MPK10096, ThermoFisher). Вкратце, линейаризованную конструкцию ДНК трансфицировали с помощью электропорации в клетки HD-BIOP3 в

Клетки Horizon Discovery (HD)-BIOP3 CHO, экспрессирующие более высокие уровни белка V1233 (20-30 мкг/мл), клоны 14, 26, 44 и 46 подвергали очистке. Все четыре клона давали подобный конечный продукт, таким образом для последующей очистки мы применяли клон 26. Кондиционированную среду, эквивалентную приблизительно 10 мг из V1233-26, подготавливали следующим образом. Кондиционированную среду, которую оттаивали при 37°C, доводили до 5% ФСБ и 0,01% (об./об.) Твин 20 и центрифугировали при 20000g в течение 30 мин при 4°C. Очищенный экстракт вводили в колонку с белком А (HiTrap™ MabSelect™Sure, 5 мл) (GE Healthcare), уравновешенную с использованием 1xФСБ и 0,01% Твин 20. Колонку промывали буфером с высоким pH и высоким содержанием соли (5 CV: 20 mM этаноламина, pH 9,2, 1,2 M NaCl, 0,01% твин 20), и связанные белки элюировали 0,1 M лимонной кислотой, pH 3,0 и сразу же нейтрализовали путем добавления 1/5 объема 1M Трис, pH 9,5. Фракции, содержащие белок Flt1, объединяли, разбавляли в 10 раз в 20 mM этаноламина, pH 9,2, 0,01% Твин 20, и вводили в анионообменную колонку HiTrap™Q HP, 5 мл (GE Healthcare). Белок Flt1, имеющийся в элюате, доводили до pH 6,8 путем добавления 10% об./об. 0,5 M Трис, pH 6,8 и вводили в колонку с гепарином HiTrap™ HP, 1 мл, уравновешенную 20 mM Трис, pH 6,8, 0,01% Твин 20. Колонку промывали 0,45 M NaCl в буфере с последующим конечным элюированием 1 M NaCl. Фракции, положительные по Flt1, объединяли и подвергали гель-фильтрационной хроматографии на колонке HiLoad Superdex 16x600 (GE Healthcare) в 10 mM Трис, pH 7,2, 0,4 M NaCl, 0,01% Твин 20. Фракции, не содержащие высокомолекулярные агрегаты, объединяли, концентрировали после связывания на колонке с гепарином HiTrap™ HP, 1 мл с последующим элюированием 1M NaCl, как указано ранее.

Элюированные белки подвергали диализу с использованием устройства для диализа Float-A-Lyzer^RG2, MWCO 100 кДа или 50 кДа (Spectrum Laboratories), и концентрировали с использованием центрифужных фильтров UltraCel 50k, Amicon.

Для крупномасштабной очистки (кондиционированная среда, эквивалентная 50 мг белка) способ модифицировали следующим образом: хроматографию с белком А осуществляли с использованием колонки HiTrapPrismA, 5 мл с двумя стадиями промывки с использованием буфера 1 (50 mM Трис, pH 8,5, 1,2 M NaCl, 0,5 M аргинина, 0,01% твина 20) и буфера 2 (25 mM фосфата натрия, pH 6,5, 200 mM NaCl, 0,01% твина 20) до окончательного элюирования в 0,1 M лимонной кислоте. HiTrapQ осуществляли с использованием 20 mM Трис, pH 8,5, а для промывки колонки с

гепарином HiTrap использовали раствор с немного большим содержанием соли (0,55 М). Стадию гель-фильтрации осуществляли в более широкой колонке (HiLoad 26x600) в буфере, содержащем 10 мМ гистидина, рН 6,0, 80 мМ NaCl, 0,01% твина 20. Вместо диализа колонку PD10 использовали для замены буфера, а готовый белок хранили в 10 мМ ацетата натрия, рН 5,0, 7% трегалозы и 0,01% твина 20.

Хроматографию проводили в системе FPLC АКТА Avant (GE Healthcare). Колонку и устройство подвергали санитарной обработке (очистка на месте) с помощью 0,5 н. NaOH до каждого цикла. Чистоту белка определяли с помощью ДСН-PAGE и окрашивания серебром после каждой стадии. Качество препарата готового продукта определяли с помощью аналитической гель-фильтрации.

Оценку общего белка выполняли с помощью реагента-красителя для анализа белка (Bio-Rad) и с помощью набора ELISA Fc для белков Fc человека и IgG человека (Syd Labs). Общее извлечение белка составляло приблизительно 10%, а в конечном белке достигался уровень эндотоксина около 0,004 МЕ/мг и НСР 150 нг/мг.

ССЫЛКИ

[1] Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 1987, 235:442-7.

[2] Klagsbrun M, D'Amore PA: Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991, 53:217-39.

[3] Ferrara N, Adamis AP: Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2016, 15:385-403.

[4] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med* 2003, 9:669-76.

[5] Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular Endocrinology* 1991, 5:1806-14.

[6] Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *Journal of Biological Chemistry* 1991, 266:11947-54.

[7] Park JE, Keller G-A, Ferrara N: The vascular endothelial growth factor isoforms (VEGF): Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular Biology of the Cell* 1993, 4:1317-26.

- [8] Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT: Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 2002, 16:2684-98.
- [9] Ferrara N: Binding to the extracellular matrix and proteolytic processing: two key mechanisms regulating vascular endothelial growth factor action. *Mol Biol Cell* 2010 5 21:687-90.
- [10] de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992, 255:989-91.
- 10 [11] Terman BI, Dougher Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P: Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem-Biophys-Res-Commun* 1992, 187:1579-86 issn: 0006-291x.
- [12] Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, 15 Kalkkinen N, Alitalo K: A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO-J* 1996, 15:1751 issn: 0261-4189.
- [13] Alitalo K, Tammela T, Petrova TV: Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005, 438:946-53.
- 20 [14] Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L: VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7:359-71.
- [15] Ferrara N: VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:795-803.
- [16] Miller JW, Le Couter J, Strauss EC, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor 25 a in intraocular vascular disease. *Ophthalmology* 2013, 120:106-14.
- [17] Apte RS, Chen DS, Ferrara N: VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 2019, 176:1248-64.
- [18] Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N: Humanization of an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal 30 Antibody for the Therapy of Solid Tumors and Other Disorders. *Cancer Res* 1997, 57:4593-9.
- [19] Chen Y, Wiesmann C, Fuh G, Li B, Christinger HW, McKay P, de Vos AM, Lowman HB: Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity- matured Fab in complex with antigen. *Journal of Molecular Biology* 1999, 35 293:865-81.

- [20] Chamow SM, Ryll T, Lowman HB, Farson D: Therapeutic Fc-Fusion Proteins. Wiley Blackwell, 2014.
- [21] Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS: VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:11393-8.
- [22] Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research G, Maguire MG, Martin DF, Ying GS, Jaffe GJ, Daniel E, Grunwald JE, Toth CA, Ferris FL, 3rd, Fine SL: Five- Year Outcomes with Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment of Neovascular Age- Related Macular Degeneration: The Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials. *Ophthalmology* 2016, 123:1751-61.
- [23] Holz FG, Tadayoni R, Beatty S, Berger A, Cereda MG, Cortez R, Hoyng CB, Hykin P, Staurenghi G, Heldner S, Bogumil T, Heah T, Sivaprasad S: Multi-country real-life experience of anti-vascular endothelial growth factor therapy for wet age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2015, 99:220-6.
- [24] Regula JT, Lundh von Leithner P, Foxton R, Barathi VA, Cheung CM, Bo Tun SB, Wey YS, Iwata D, Dostalek M, Moelleken J, Stubenrauch KG, Nogoceke E, Widmer G, Strassburger P, Koss MJ, Klein C, Shima DT, Hartmann G: Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAb optimized for neovascular eye diseases. *EMBO Mol Med* 2016, 8:1265-88.
- [25] Rodrigues GA, Mason M, Christie LA, Hansen C, Hernandez LM, Burke J, Luhrs KA, Hohman TC: Functional Characterization of Abicipar-Pegol, an Anti-VEGF DARPIn Therapeutic That Potently Inhibits Angiogenesis and Vascular Permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018, 59:5836-46.
- [26] Vorum H, Olesen TK, Zinck J, Hedegaard M: Real world evidence of use of anti-VEGF therapy in Denmark. *Curr Med Res Opin* 2016:1-32.
- [27] Davis-Smyth T, Chen H, Park J, Presta LG, Ferrara N: The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO Journal* 1996, 15:4919-27.
- [28] Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM: Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 1997, 91:695-704.
- [29] Christinger HW, Fuh G, de Vos AM, Wiesmann C: The Crystal Structure of Placental Growth Factor in Complex with Domain 2 of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1. *J Biol Chem* 2004, 279:10382-8.

- [30] Markovic-Mueller S, Stutfeld E, Asthana M, Weinert T, Bliven S, Goldie KN, Kisko K, Capitani G, Ballmer-Hofer K: Structure of the Full-length VEGFR-1 Extracellular Domain in Complex with VEGF-A. *Structure* 2017, 25:341-52.
- [31] Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber H-P, Nguyen T-N, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH: Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Medicine* 1998, 4:336-40.
- [32] Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N: VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Med* 1999, 5:623-8.
- [33] Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller G-A, Rangel L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N: VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999, 126:1149-59.
- [34] Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA, Ferrara N: Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000, 60:6253-8.
- [35] Lissbrant IF, Hammarsten P, Lissbrant E, Ferrara N, Rudolfsson SH, Bergh A: Neutralizing VEGF bioactivity with a soluble chimeric VEGF-receptor protein flt(1-3)IgG inhibits testosterone-stimulated prostate growth in castrated mice. *Prostate* 2004, 58:57-65.
- [36] Zheng M, Deshpande S, Lee S, Ferrara N, Rouse BT: Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *J Virol* 2001, 75:9828-35.
- [37] Kim ES, Serur A, Huang J, Manley CA, McCrudden KW, Frischer JS, Soffer SZ, Ring L, New T, Zabski S, Rudge JS, Holash J, Yancopoulos GD, Kandel JJ, Yamashiro DJ: Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:11399-404.
- [38] Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol-Chem* 1992, 267:26031-7.
- [39] Malyala P, Singh M: Endotoxin limits in formulations for preclinical research. *J Pharm Sci* 2008, 97:2041-4.
- [40] Shibuya M: VEGFR and type-V RTK activation and signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, 5:a009092.
- [41] Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N: Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, *in vitro* and *in vivo*, and high

affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J-Biol-Chem* 1994, 269:25646-54 issn: 0021-9258.

- [42] Brozzo MS, Bjelic S, Kisko K, Schleier T, Leppanen VM, Alitalo K, Winkler FK, Ballmer-Hofer K: Thermodynamic and structural description of allosterically regulated VEGFR-2 dimerization. *Blood* 2012, 119:1781-8.
- [43] Kwak N, Okamoto N, Wood JM, Campochiaro PA: VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41:3158-64.
- [44] Saishin Y, Takahashi K, Lima e Silva R, Hylton D, Rudge JS, Wiegand SJ, Campochiaro PA: VEGF-TRAP(R1R2) suppresses choroidal neovascularization and VEGF-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *J Cell Physiol* 2003, 195:241-8.
- [45] Campa C, Kasman I, Ye W, Lee WP, Fuh G, Ferrara N: Effects of an anti-VEGF-A monoclonal antibody on laser-induced choroidal neovascularization in mice: optimizing methods to quantify vascular changes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, 49:1178-83.
- [46] Bogdanovich S, Kim Y, Mizutani T, Yasuma R, Tudisco L, Cicatiello V, Bastos-Carvalho A, Kerur N, Hirano Y, Baffi JZ, Tarallo V, Li S, Yasuma T, Arpitha P, Fowler BJ, Wright CB, Apicella I, Greco A, Brunetti A, Ruvo M, Sandomenico A, Nozaki M, Ijima R, Kaneko H, Ogura Y, Terasaki H, Ambati BK, Leusen JH, Langdon WY, Clark MR, Armour KL, Bruhns P, Verbeek JS, Gelfand BD, De Falco S, Ambati J: Human IgG1 antibodies suppress angiogenesis in a target-independent manner. *Signal Transduct Target Ther* 2016, 1.
- [47] Silva RLE, Kanan Y, Mirando AC, Kim J, Shmueli RB, Lorenc VE, Fortmann SD, Sciamanna J, Pandey NB, Green JJ, Popel AS, Campochiaro PA: Tyrosine kinase blocking collagen IV-derived peptide suppresses ocular neovascularization and vascular leakage. *Sci Transl Med* 2017, 9.
- [48] Lee JE, Kim C, Yang H, Park I, Oh N, Hua S, Jeong H, An HJ, Kim SC, Lee GM, Koh GY, Kim HM: Novel glycosylated VEGF decoy receptor fusion protein, VEGF-Grab, efficiently suppresses tumor angiogenesis and progression. *Mol Cancer Ther* 2015, 14:470-9.
- [49] Park M, Lee ST: The fourth immunoglobulin-like loop in the extracellular domain of FLT-1, a VEGF receptor, includes a major heparin-binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 264:730-4.
- [50] Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C: VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003, 161:1163-77.
- [51] Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR: Distribution of vascular permeability factor (vascular

endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *Journal of Experimental Medicine* 1991, 174:1275-8.

[52] Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W: Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. *Nature* 1992, 359:845-8.

5 [53] Qu H, Nagy JA, Senger DR, Dvorak HF, Dvorak AM: Ultrastructural localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) to the abluminal plasma membrane and vesiculovacuolar organelles of tumor microvascular endothelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1995, 43:381-9.

[54] Yang D, Singh A, Wu H, Kroe-Barrett R: Comparison of biosensor platforms in the evaluation of high affinity antibody-antigen binding kinetics. *Anal Biochem* 2016, 10 508:78-96.

[55] Yang J, Wang X, Fuh G, Yu L, Wakshull E, Khosraviani M, Day ES, Demeule B, Liu J, Shire SJ, Ferrara N, Yadav S: Comparison of binding characteristics and *in vitro* activities of three inhibitors of vascular endothelial growth factor a. *Mol Pharm* 2014, 15 11:3421-30.

[56] Gerber HP, Wu X, Yu L, Weissman C, Liang XH, Lee CV, Fuh G, Olsson C, Damico L, Xie D, Meng YG, Gutierrez J, Corpuz R, Li B, Hall L, Rangell L, Ferrando R, Lowman H, Peale F, Ferrara N: Mice expressing a humanized form of VEGF-A may provide insights into safety and efficacy of anti-VEGF antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 20 104:3478-83.

[57] Bachmann MF, Kalinke U, Althage A, Freer G, Burkhart C, Roost H, Aguet M, Hengartner H, Zinkernagel RM: The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 1997, 276:2024-7.

[58] Morin J, Luu TM, Superstein R, Ospina LH, Lefebvre F, Simard MN, Shah V, Shah PS, Kelly EN, Canadian Neonatal N, the Canadian Neonatal Follow-Up Network I: Neurodevelopmental Outcomes Following Bevacizumab Injections for Retinopathy of Prematurity. *Pediatrics* 2016, 137.

[59] Sankar MJ, Sankar J, Chandra P: Anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs for treatment of retinopathy of prematurity. *Cochrane Database Syst Rev* 2018, 30 1:CD009734.

[60] Barleon B, Totzke F, Herzog C, Blanke S, Kremmer E, Siemeister G, Marme D, Martiny-Baron G: Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272:10382-8.

- [61] Roberts CJ: Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. Trends Biotechnol 2014, 32:372-80.
- [62] Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I: Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. J Immunotoxicol 2014, 11:99-109.
- 5 [63] Yu L, Wu X, Cheng Z, Lee CV, Lecouter J, Campa C, Fuh G, Lowman H, Ferrara N: Interaction between Bevacizumab and Murine VEGF-A: A Reassessment. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008, 49:522-7.
- [64] Xin H, Zhong C, Nudleman E, Ferrara N: Evidence for Pro-angiogenic Functions of VEGF-Ax. Cell 2016, 167:275-84 e6.
- 10 [65] Lambert V, Lecomte J, Hansen S, Blacher S, Gonzalez ML, Struman I, Sounni NE, Rozet E, de Tullio P, Foidart JM, Rakic JM, Noel A: Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. Nat Protoc 2013, 8:2197-211.
- [66] Smith LE, Kopchick JJ, Chen W, Knapp J, Kinose F, Daley D, Foley E, Smith RG, Schaeffer JM: Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. Science 1997, 276:1706-9.
- 15 [67] Chen J, Connor KM, Aderman CM, Smith LE: Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. J Clin Invest 2008, 118:526-33.
- [68] Gardiner TA, Gibson DS, de Gooyer TE, de la Cruz VF, McDonald DM, Stitt AW: Inhibition of tumor necrosis factor-alpha improves physiological angiogenesis and reduces pathological neovascularization in ischemic retinopathy. Am J Pathol 2005, 166:637-44.
- 20 [69] Chen J, Connor KM, Aderman CM, Willett KL, Aspegren OP, Smith LE: Suppression of retinal neovascularization by erythropoietin siRNA in a mouse model of proliferative retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009, 50:1329-35.
- [70] Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE: Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A 1995, 92:10457-61 issn: 0027-8424.
- 30 [71] Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, Robinson G, Driver S, Bischoff J, Zhang B, Schaeffer JM, Senger DR: Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. Nature Medicine 1999, 5:1390-5.

[72] Lange C, Ehlken C, Martin G, Konzok K, Moscoso Del Prado J, Hansen LL, Agostini HT: Intravitreal injection of the heparin analog 5-amino-2-naphthalenesulfonate reduces retinal neovascularization in mice. *Exp Eye Res* 2007, 85:323-7.

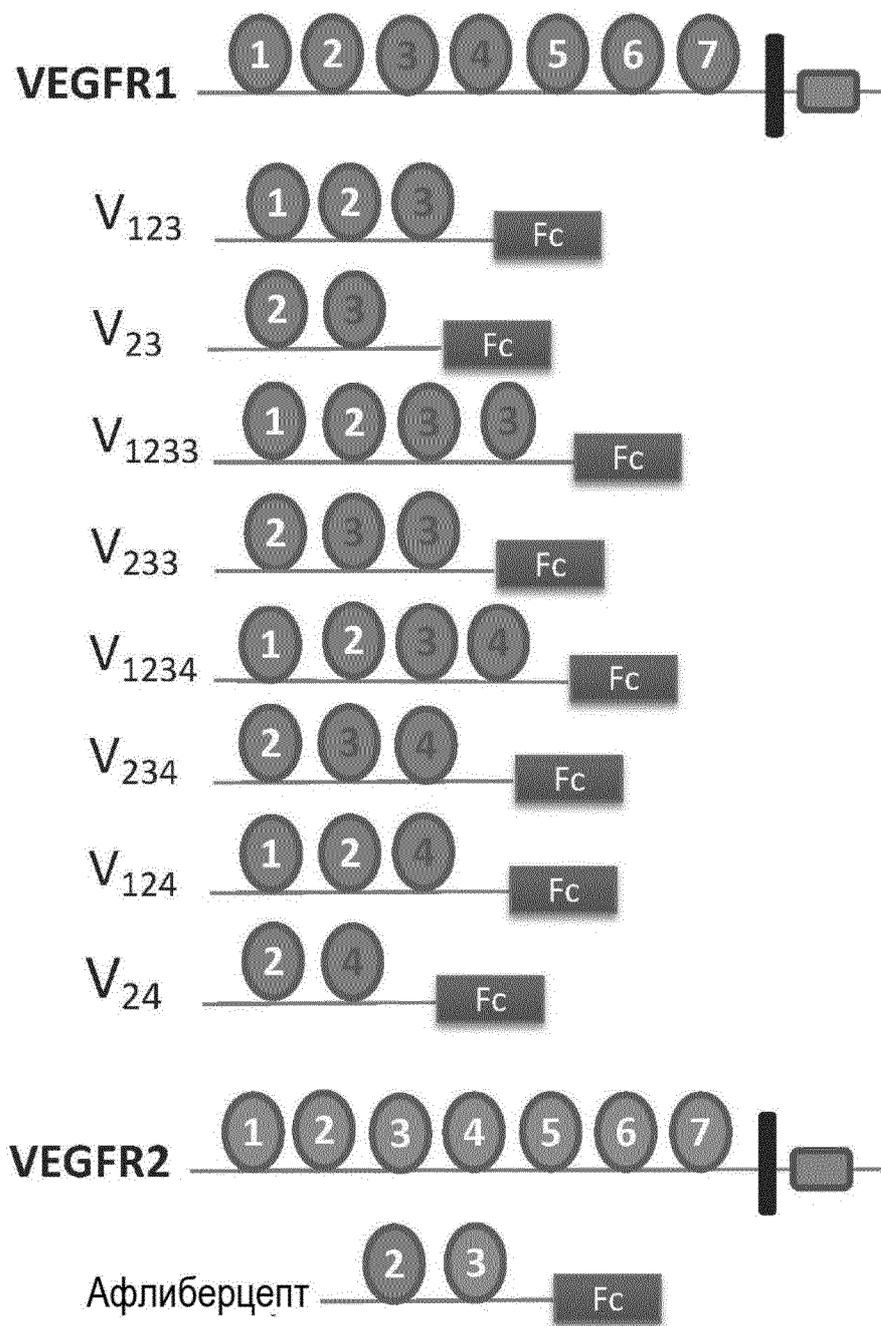
5 [73] Xiao S, Bucher F, Wu Y, Rokem A, Lee CS, Marra KV, Fallon R, Diaz-Aguilar S, Aguilar E, Friedlander M, Lee AY: Fully automated, deep learning segmentation of oxygen-induced retinopathy images. *JCI Insight* 2017, 2.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения офтальмологического расстройства, связанного с VEGF, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение интравитреально субъекту первого терапевтически эффективного количества агента против VEGF и введение интравитреально субъекту второго терапевтически эффективного количества агента против VEGF в течение от 10 до 30 недель после более раннего введения, при этом агент против VEGF содержит участок, связывающий VEGF, функционально связанный с Fc-IgG, причем участок, связывающий VEGF, содержит по меньшей мере один домен, связывающий VEGF, который представляет собой IgG-подобный домен 2 VEGFR-1.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что второе терапевтически эффективное количество агента против VEGF вводят интравитреально в течение от 16 до 24 недель после более раннего введения.
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что последовательные введения терапевтически эффективного количества агента против VEGF осуществляют интравитреально в течение от 10 до 30 недель после предшествующего введения в течение периода по меньшей мере один год.
4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что агент против VEGF обладает способностью связываться со стекловидным телом, большей чем у афлиберцепта.
5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что агент против VEGF обладает способностью ингибировать пролиферацию эндотелиальных клеток, стимулируемую VEGF, связанную со стекловидным телом, большей чем у афлиберцепта.
6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что агент против VEGF обладает способностью ингибировать стимулируемый VEGF митогенез, большей чем у афлиберцепта.
7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что участок, связывающий VEGF, состоит по существу из IgG-подобных доменов 1, 2 и 3 VEGFR-1 (V_{1-2-3}).
8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что участок, связывающий VEGF, состоит по существу из IgG-подобных доменов 2 и 3 VEGFR-1 (V_{2-3}).

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что участок, связывающий VEGF, состоит по существу из IgG-подобных доменов 1, 2, 3 и 3 VEGFR-1 ($V_{1-2-3-3}$).
10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что участок, связывающий VEGF, состоит по существу из IgG-подобных доменов 2, 3 и 3 VEGFR-1 (V_{2-3-3}).
11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество агента против VEGF составляет от около 1 до 10 мг.
12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество агента против VEGF составляет от около 3 до 6 мг.
13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что связанное с VEGF офтальмологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из неоваскулярной возрастной макулярной дистрофии, хориоидальной неоваскуляризации на фоне близорукости, пролиферативной диабетической ретинопатии, диабетического отека желтого пятна, обструкции сосудов сетчатки, такой как окклюзия вены сетчатки, глазных опухолей, синдрома фон Гиппеля-Линдау, ретинопатии недоношенных и полиповидной хориоидальной васкулопатии.
14. Способ стимуляции внутриглазной неоваскуляризации у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение интравитреально субъекту первого терапевтически эффективного количества агента против VEGF и введение интравитреально субъекту второго терапевтически эффективного количества агента против VEGF в течение от 10 до 30 недель после более раннего введения, при этом агент против VEGF содержит участок, связывающий VEGF, функционально связанный с Fc-IgG, причем участок, связывающий VEGF, содержит по меньшей мере один домен, связывающий VEGF, который представляет собой IgG-подобный домен 2 VEGFR-1.
15. Фармацевтическая композиция для применения в лечении связанного с VEGF офтальмологического расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, при этом агент против VEGF является таким, как представлено в любом из пп. 1-13.

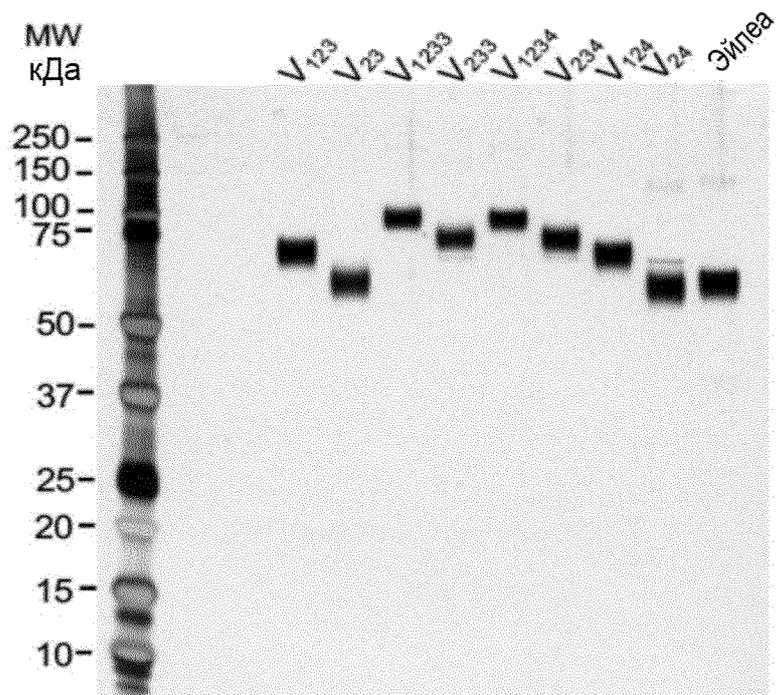
Структура ингибиторов VEGF



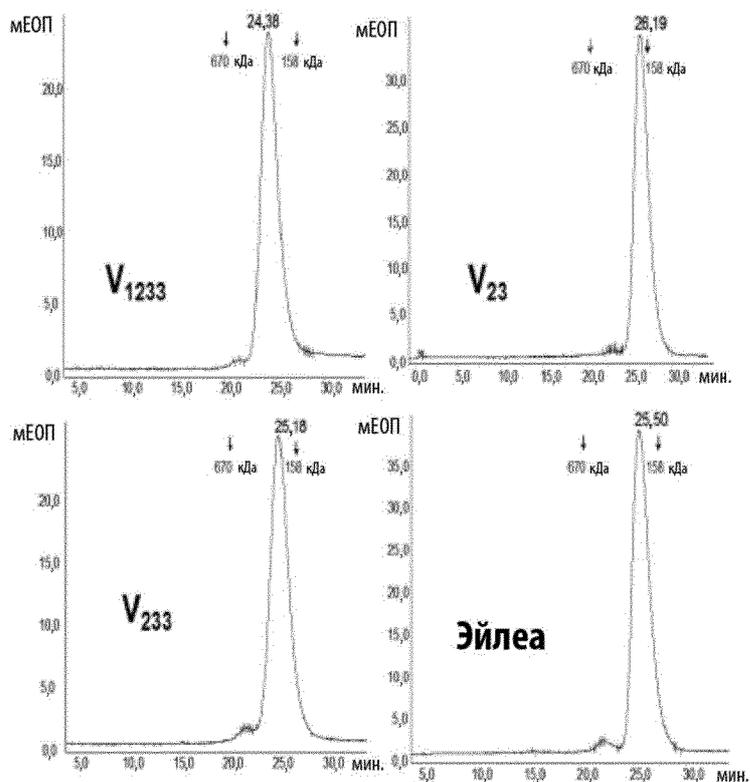
Фиг. 1

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

2/17



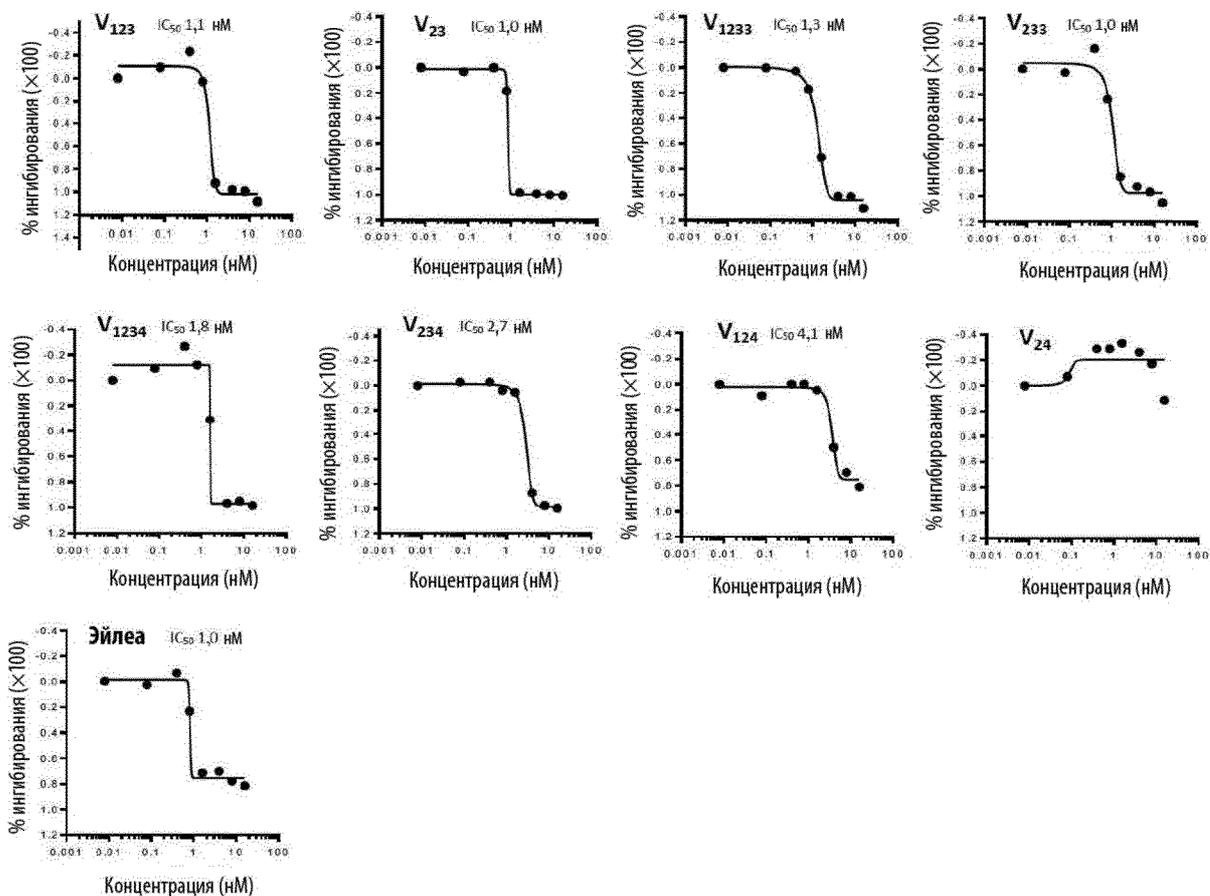
Фиг. 2А



Фиг. 2В

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

3/17

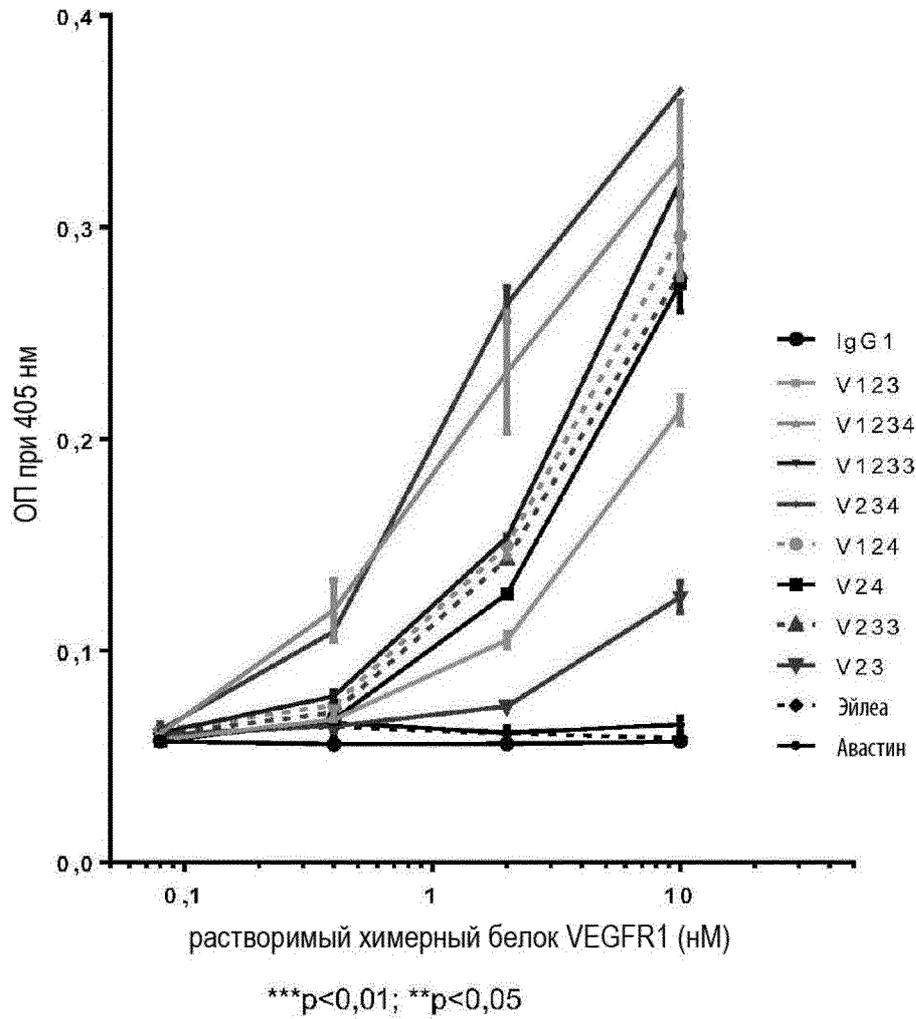


Фиг. 3

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

4/17

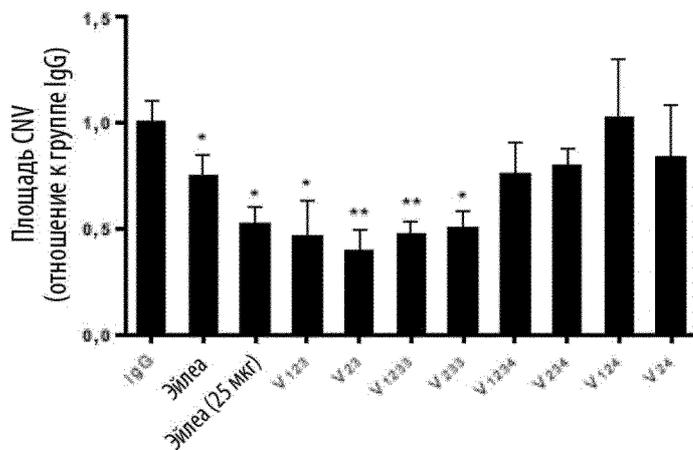
связывание со стекловидным телом быка



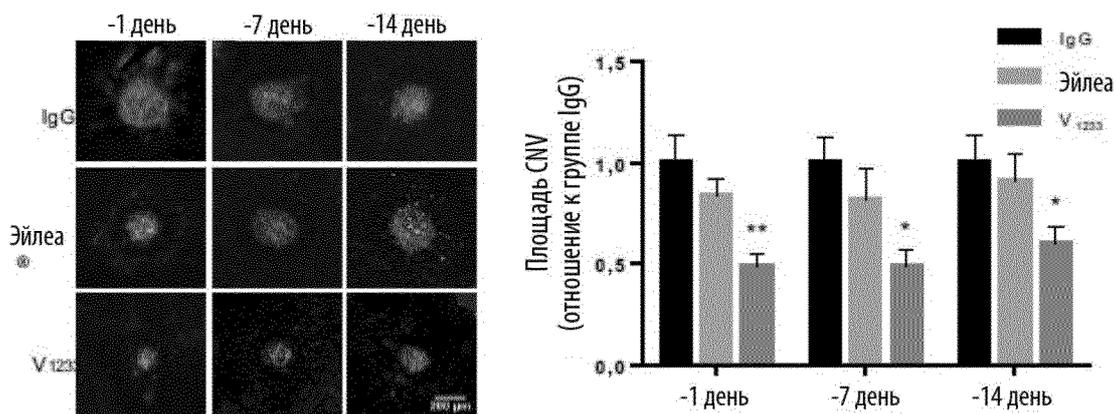
Фиг. 4

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

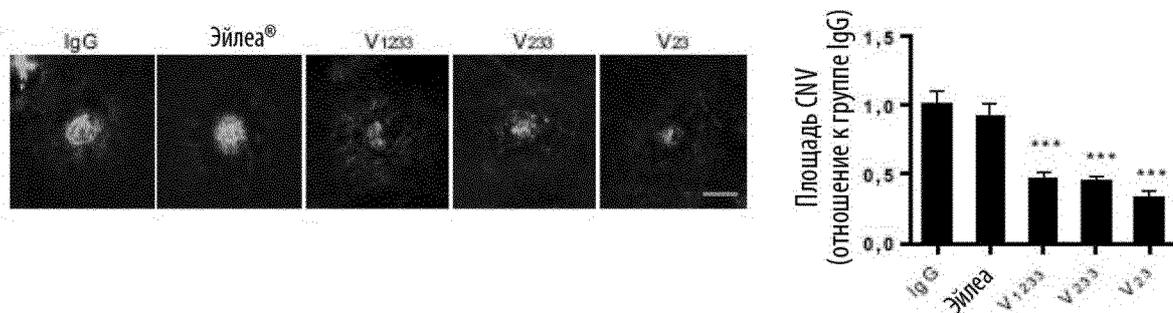
5/17



Фиг. 5А



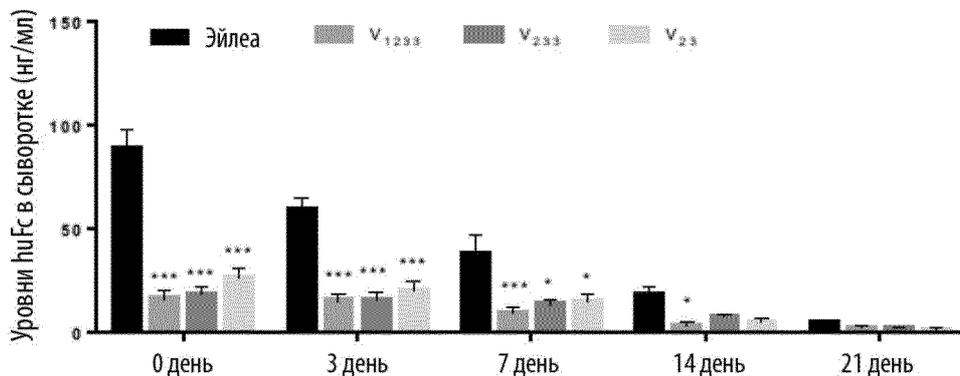
Фиг. 5В



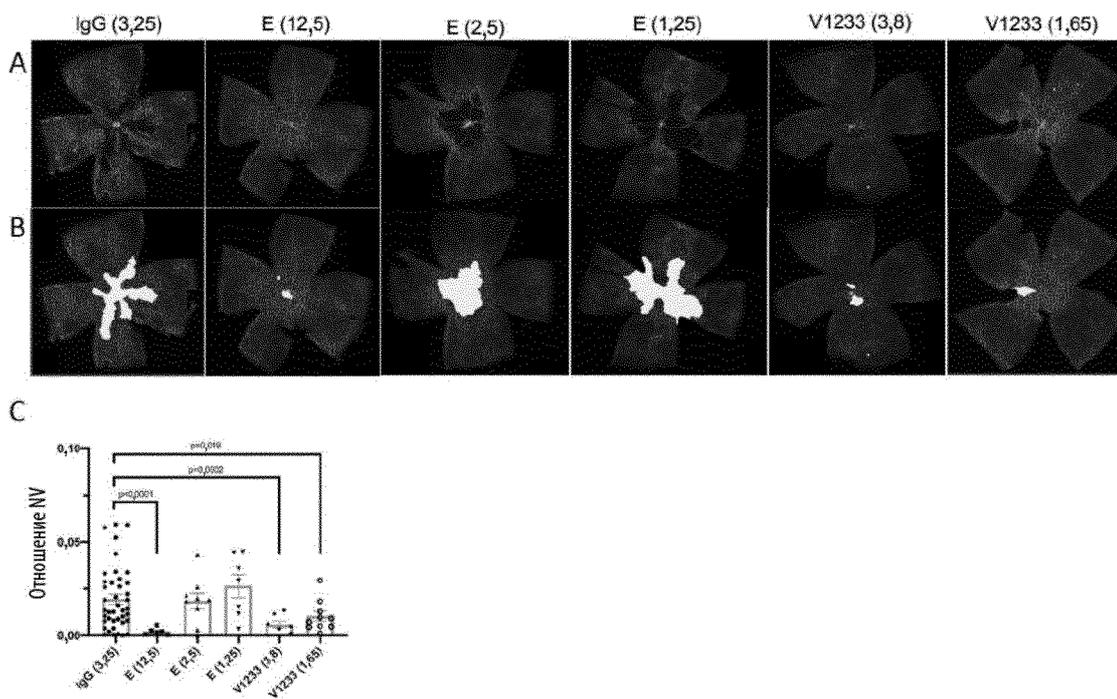
Фиг. 5С

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

6/17



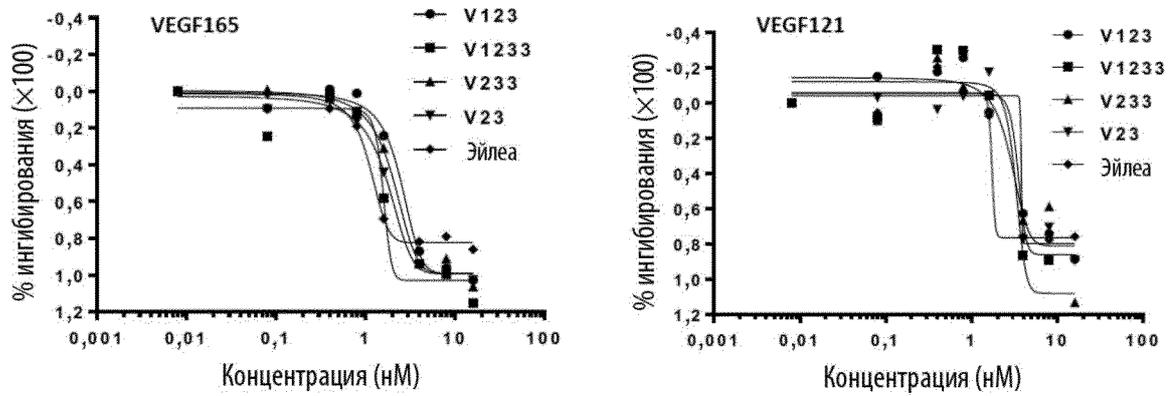
Фиг. 5D



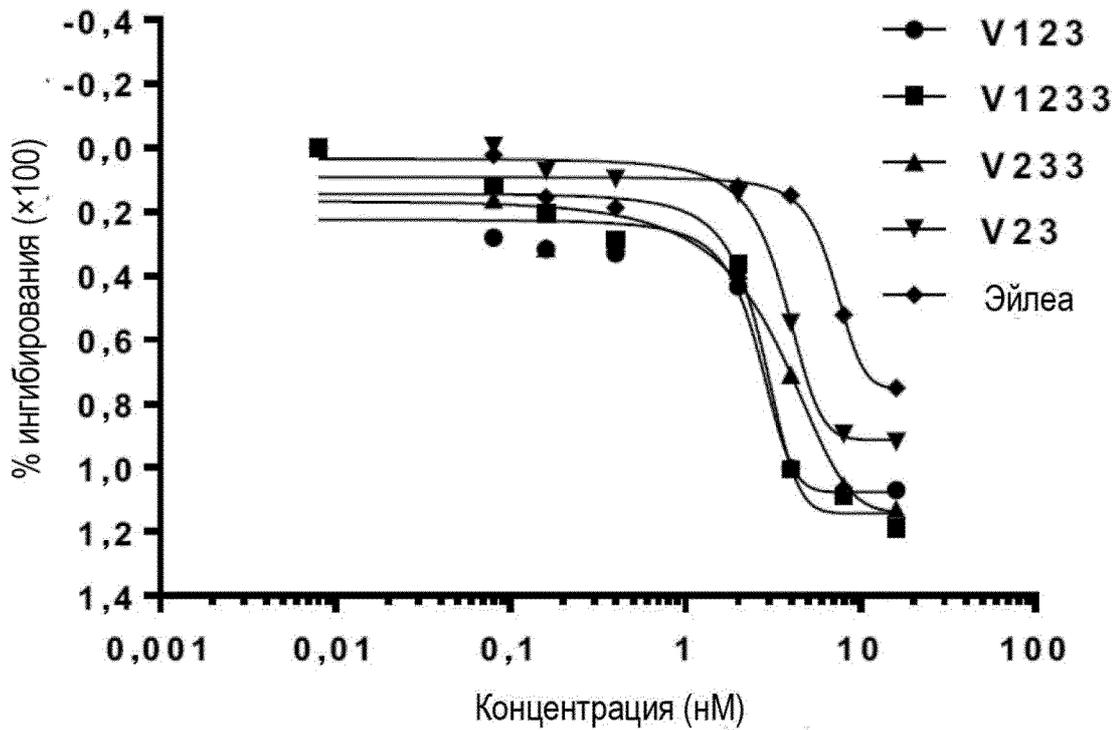
Фиг. 6A-6C

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ
НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

7/17



Фиг. 7

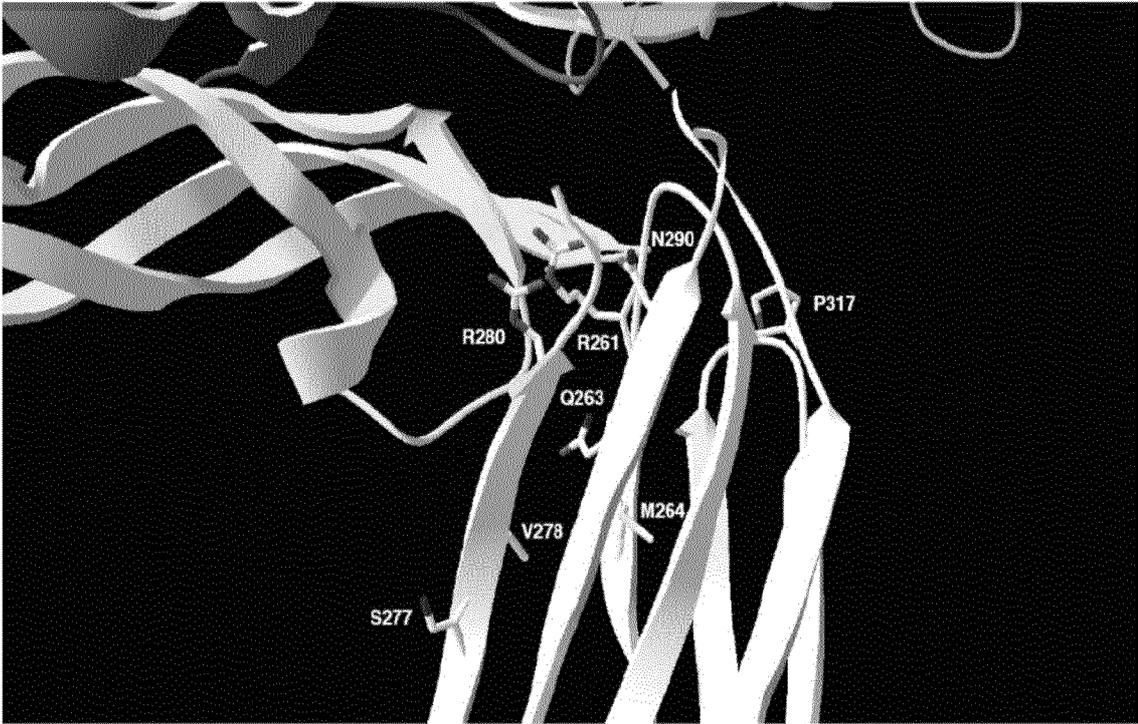


Анализ пролиферации HUVEC

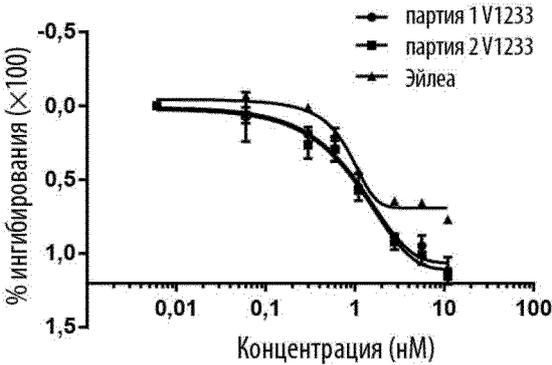
Фиг. 8

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ
НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

8/17

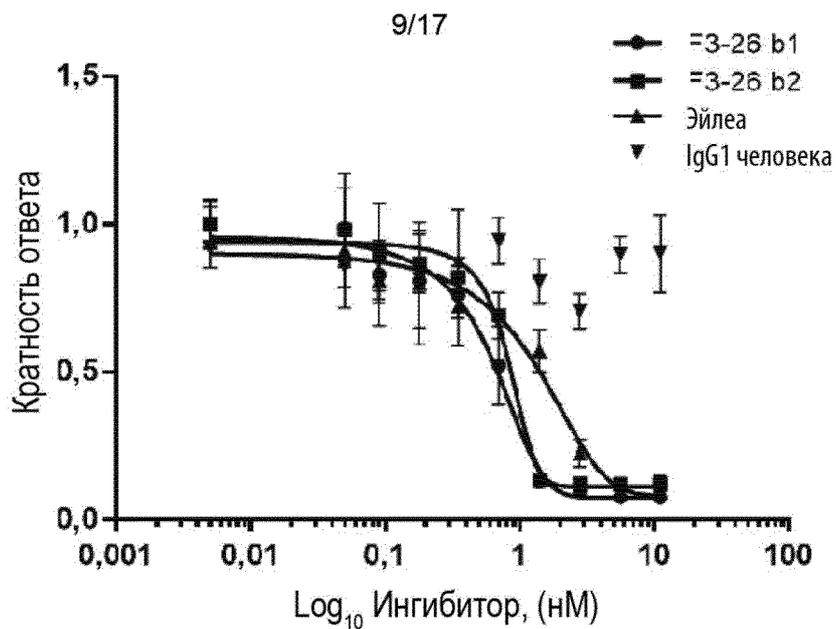


Фиг. 9

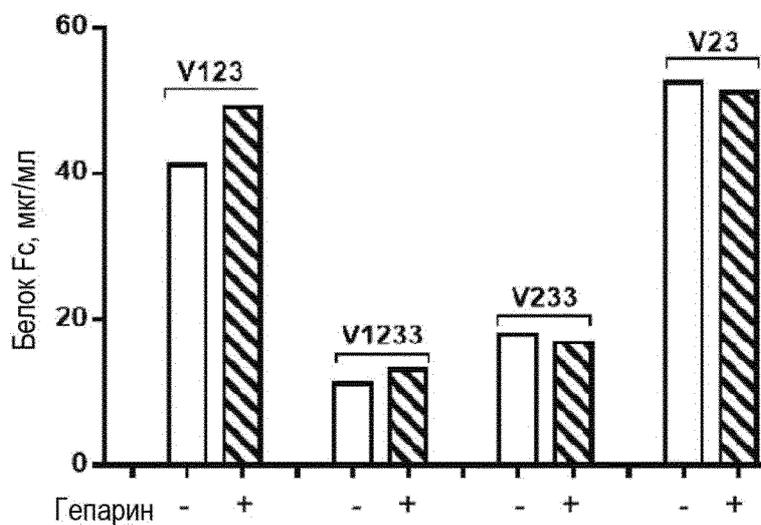


Фиг. 10

**ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ
НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ**



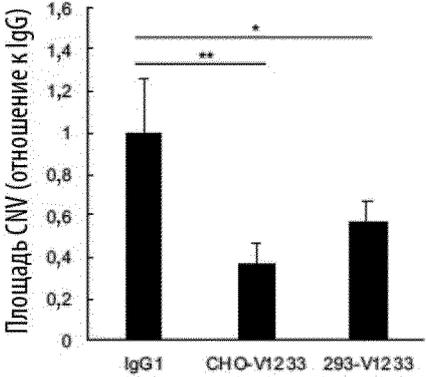
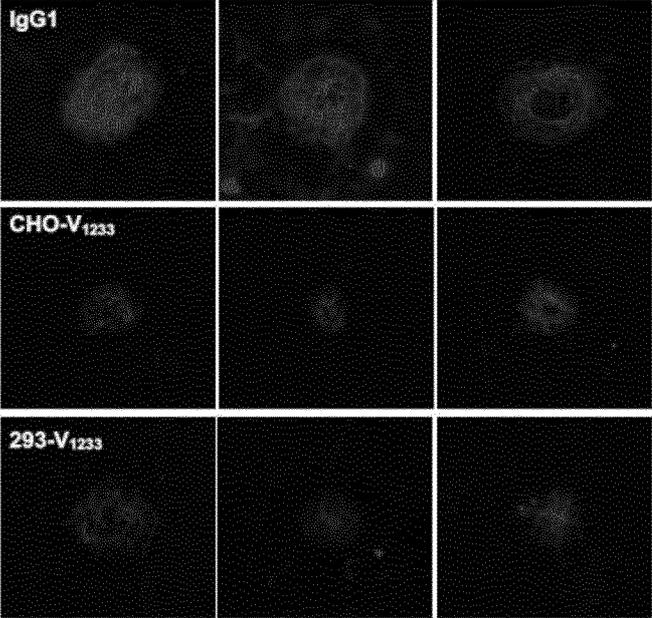
Фиг. 11



Фиг. 12

**ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ
НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ**

10/17



Фиг. 13

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

11/17

V₁₂₃

Аминокислотная последовательность

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVS
KESERLSITKSACGRNGKQFCSTLILNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGR
EMYSSEIPELTHMTDGRELVIPCRVTSFNITVTLKFFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGL
LTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTIIDVQIISTPRPVKLLRGLTLVNLCTATPLNTRVQMTWSYPDEK
NKRASVRRRIQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNITSVHIYDKDKHTCPCC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCAAGGATC
TAGTTCAGGTTCAAAATTAAGATCCTGAACTGAGTTTAAAAGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAG
GCCAGACTGCATCTCCAATGCAGGGGGAAGCAGCCATAAATGGTCTTTGCCGTAATGGTGAGT
AAGGAAAGCGAAAGGCTGAGCATAACTAAATCTGCTGTGGAAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTAC
TTAAACCTTGAACACAGCTCAAGCAAACCACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTGTACCTA
CTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAACTGCAATCTATATATTTATAGTGATACAGGTAGACCTTTCGT
GAGATGTACAGTGAATCCCGAAATATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCTGCGG
GGTTACGTACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTTATCCCTGATGGAA
AAGCATAAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCAATCATATCAAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTT
CTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCAA
TACAATCATAGATGTCCAATAAGCACACCAACCGCCAGTCAAAATTAAGTAGAGCCATACTCTGTCC
TCAATTTGACTGCTACCACCTCCCTTGAACACGAGAGTTCAAAATGACCTGGAGTTACCTGATGAAAA
AATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAATTGACCAAGCAATCCCATGCCAACAATTTCTACAGTGT
TCTTACTATTGACAAAATGCAGAACAAGACAAAGGACTTTATACTTGTGTTAAGGAGTGGACCAT
CAITCAAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCAAAACTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCAT
GATCTCCGGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTGCAGCGTCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
GTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTCCAGCCGCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCTCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAAGCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACATAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTCTTCTCTTACAGCAAGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAAGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCAC
AACCACTACACGCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Серый с курсивом: сигнальный пептид; Желтый: Ig-подобный домен 1; Синий: Ig-подобный домен 2;

Серый: Ig-подобный домен 3; Черный с подчеркиванием: фрагмент IgG1-Fc человека

Фиг. 14

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

12/17

V₂₃ Аминокислотная последовательность

MVSYWDTGVL¹LCALLS²CLLL²TGS²SSGI²FISDTGR²PFVEMYSEIPELIHMTE²GRELVIPCRVT²SPNITV²
TLKKFPLDTLIPDGKRIIWD²SRKGFII²SMATYKE²IGLLTCEATVNGHLYKINYLT²HRQINTI²IDVQIS²
TPRPVKLLRGHTLVLNCTAT²TPLNTRVQMT²WSYP²DEKNKRA²SVRRRIDQSN²SHANIFY²SVLT²IDKMQN²
KDKGLYTCR²VRSG²PSFKSVNT²SVNHYD²KDKTHTC²PPC²PAPELLGGPSVFLF²PPKPKDT²LMISRT²PEVT²
CVVV²DV²SHED²PEVK²FNWYVD²GVE²VHNAKTK²PREE²QYNSTYRVVSVLTVLHQD²WLN²GKE²YKCKVSN²KAL²
PAPIEK²TISKAKGQ²PREPQV²YTL²PPSRDELTKNQVSLT²CLVKGF²YPSDIA²VEWES²NGQPENNY²KTTP²
VLDS²DG²SFF²LYSKLIV²DKSRWQ²GNVF²SCSV²MHEALHNHYT²QKSL²SLSPGK²

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCACAGGATC
TAGTTCAGGTATATTTATTAGTGATACAGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAATCCCGAAA
TTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCAT¹TCCCTGCCGGGTTACGT¹CACCTAA¹CATCACT¹GTT
ACTTTAAAAAGTTTCCACT¹TGACACT¹TTGATCCCTGATGGAAAAACGCATAATCTGGACAGTAGAAA
GGGCTT¹CATCATA¹TCAAATG¹CAACGT¹CAAAAGAAATAGGGCTTC¹TGACCTGTGAAGCAACAGTCAATG
GGCATT¹TGTATAAGACAAACTAT¹CTCACACATCGACAAACCAATACAATCA¹TAGATGT¹CCAAATAAGC
ACACCA¹CGCCAGTCAAAT¹ACTTAGAGGCCATACTCTTGT¹CCTCAATGTACTGCTA¹CCACTCCCTT
GAACAC¹GAGAGTTCAAATGACCTGGAGTTACCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGC¹GAC
GAATTGACCAAGCAAT¹TCCCAT¹GCCAACATATTCTACAGT¹GTTCTTACTATTGACAAATG¹CAGAAC
AAAGACAAAGGACTTTATAC¹TGTCGT¹GTAAGGAGTGACCATCAATCAAATCTGT¹TAAACACTCAGT
GCATATATATGATAAA¹GACAAA¹ACTCACATGCCACCGT¹GCC¹CAGCACCTGAACTCCTGGGGG¹GAC
CGTCAGTCT¹TCCCT¹CCCCCAAAAC¹CCAAGGACACCCCTCATGATCT¹CCCGGACCCCTGAGGTCACA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC¹CCTGAGGTCAAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT¹GGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA¹GCCTCC
TCACCGTCC¹TGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAAACAAAGGCCCTC
CCAGCCCCATCGAGAAAACCAT¹CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACCAAGGTGTACACCT
GCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCGACCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGGCAAGGTG¹CAGCA
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCGGTAAA

Серый с курсивом: сигнальный пептид; Синий: Ig-подобный домен 2; Серый: Ig-подобный домен 3;

Черный с подчеркиванием: фрагмент IgG1-Fc человека

Фиг. 15

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

13/17

V₁₂₃₃

Аминокислотная последовательность

MVSYWDTGVLLCALLSCILLTSSSSGSKLKDPELSLKGTOHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVS
KESERLSITKACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCYLAVPTSKKETEASAIYIFISDTGRPFV
EMYSEIFEIHMTEGRELVIPCRVITSPNITVTLLKFFPDLTLPDGRRIIWDSSRKGFIISNATYKEIGL
LTCEATVNGHLYKTNLYLHRQNTIIDVQISIPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEK
NKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIIDKMQNKDKGLYICRVRSGPSPFKSVNTSVHIYDKAVQISTPRP
VKLLRGHTLVLNCTATPLNTRVQMTWSYPDEKKNRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIIDKMQNKDKG
LYTCRVRSGPSPFKSVNTSVHIYDKDKHTCPCPAPELGGPSVFLFPKPKDILMISRTPEVTCVVV
DVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPEVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGCTGCTTCTCACAGGATC
TAGTTCAGGTCAAATTAAGATCCTGAACGAGTITAAAAGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAG
GCCAGACATGCATCTCCAATGCAGGGGGGAAGCAGCCATAAATGGTCTTTGCCGTAATGGTGGT
AAGGAAAGCGAAGGCTGAGCATAACTAAATCTGCCCTGTGGAAGAAATGGCAAAACAATTCTGCAGTAC
TTAACCTTGAACACAGCTCAAGCAAACCCACACTGGCTTCTACAGCTGCAAAATATCTAGCTGTACCTA
CTTCAAGAAGAGGAAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACAGGTAGACCTTTCGTA
GAGATGTACAGTGAATGCCCGAAATATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCAATCCCTGGCG
GGTTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAGTITCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAA
AACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAAATGCAACGTACAAGAAATAGGGCTT
CTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCAA
TACAAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCCACGCCAGTCAAAATACTTAGAGGCCATACTCTTGTCC
TCAATGTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGTICAAATGACCTGGAGTACCCCTGATGAAAA
AATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAATTGACCAAAGCAATTCCTCATGCCAACATATCTACAGTGT
TCTTACTATTGACAAAATGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACCTTGTGCGTAAGGAGTGGACCAT
CATTCAAATCTGTAAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCAGTCCAAATAAGCACACCCACGCCA
GTCAAATTACTTAGAGGCCATACTCTTGTCCCTCAATTGTAAGTCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGT
TCAAATGACCTGGAGTACCCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAATGACCAA
GCAATCCCATGCCAACATATCTACAGTGTCTTACTATTGACAAAATGCAGAACAAAGACAAAGGA
CTTTACTTTGTCGTGTAAGGAGTGGACCATCAATCAAATCTGTAAACACCTCAGTGCATATATATGA
TAAAGACAAAATCACACATGCCACCGTGCACAGCCTGAACTCCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG
GACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTICAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGC
ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC
GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACACAGGTGTACACCTTGCCTCCATCCC
GGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAGCCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACAAAGACCCAGCTCCCGTCTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAA

Серый с курсивом: сигнальный пептид; Желтый: Ig-подобный домен 1; Синий: Ig-подобный домен 2;

Серый: Ig-подобный домен 3; Черный с подчеркиванием: фрагмент IgG1-Fc человека

Фиг. 16

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

14/17

V₂₃₃

Аминокислотная последовательность

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITV
TLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQNTNIIIDVQIS
TFRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIIDKMQN
KDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPD
EKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIIDKMQNKKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKDKHTHCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMNEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTAC TGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATC
TAGTTCAGGTA TATTTATTAGTGATACAGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCGAAA
TTATACACATGACTGAAGGAAGGAGCTCGTCATTCCTGCGGGTTACGTACCTAACATCACTGTT
ACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAA
GGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTCACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATG
GGCATTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAAACAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGC
ACACCACGCCCAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTCTTGTCCTCAATTGTACTGCTACCACTCCCTT
GAACACGAGAGTTCAAATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAAGCGAC
GAATTGACCAAAGCAATCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTCTTACTATTGACAAAATGCGAAGC
AAAGACAAAGGACTTTATACTTGTGCTGTAAGGAGTGGACCATCATTCAAATCTGTAAACACTCAGT
GCATATATATGATAAAGCAGTCCAAATAAGCACACCCACGCCAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTC
TTGTCTCAATTGTACTGCTACCACTCCCTTGAACAAGAGAGTTCAAATGACCTGGAGTTACCCTGAT
GAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAAGCGACGAATTGACCAAAGCAATCCCATGCCAACATATTCTA
CAGTGTCTTACTATTGACAAAATGCGAACAAGACAAAGGACTTTATACTTGTGCTGTAAGGAGTG
GACCATCATTCAAATCTGTAAACACTCAGTGCATATATATGATAAAGACAAAACCTCACACATGCCCA
CCGTGCCAGCACTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACAC
CCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG
TCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTCACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCACGCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCGGTC
AGCCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
CGCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCA
AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCT
CTGCACAACCAC TACACGCAAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Серый с курсивом: сигнальный пептид; Синий: Ig-подобный домен 2; Серый: Ig-подобный домен 3

Черный с подчеркиванием: фрагмент IgG1-Fc человека

Фиг. 17

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

15/17

V₁₂₃₄ Аминокислотная последовательность

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTOHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVS
KESERLSIITKSACGRNGKQFCSTLLNLTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRPFV
EMYSIEPEIINHTEGRELVIPCRVTSENITVTLKKFPLDILIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGL
LTCEATVNGHLYKTNLTHRQNTIILDVQISTPRFVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEK
NKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFIIVKHKR
QQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSARVYLRGYSLLIKDVTEDAGNYTILLS
IKQSNVFKNLTATLIVVVKFDKTHTCPPELPGGSPVFLFPPKPKDTLMSRTPVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQEWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSE
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTACTGGACACCGGGGTCCTGCTGTGGCGCTGCTCAGCTGCTGCTTCTCAGAGGATC
TAGTTCAGGTTCAAATTAAGAATCCTGAACTGAGTTTAAAAGCCACCCAGCACATCATGCAAGCAG
GCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGGAAGCAGCCATAAATGGTCTTTGGCTGAATGGTGGAGT
AAGCAAAGCCAAAGGCTGAGCATAACTAAATCTGCTGTGCAAGAAATGCCAAACAAATCTGCAGTAC
TTTAACTTGAACACAGCTCAAGCAAACACACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTGTACCTA
CTTCAAAGCAAGGAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACAGGTAGACCTTTTCGTA
GAGATGTACAGTGAATCCCGAATTTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTGGTCAATCCCTGCGG
GGTTAGCTCACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAGATTTCACCTTGACACTTTGATCCCTGATGCAA
AACGCATAATCTGGCAGTAGAAGGGGCTTCATCATATCAAATGCCAAGTACAAAGAAATAGGGCTT
CTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGCAATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATGCACAAACCAA
TACAATCATAGATGTCAAATTAAGCACACACAGCCAGTCAAATTAAGTACAGGOCATACTCTGTGTC
TCAATGTACTGCTACCACTCCCTTGAACAGGAGATTCAAATGACCTGGAGTTACCCCTGATGAAAAA
AATAAGAGAGCTTCCCTAAGGCGACGAATTGACCAAAGCAAATCCCATGCCAACATATCTACAGTGT
TCTTACTATTGACAAAATGCAGAACAAGACAAAGGACTTTATACTTGTGCTGTAAGGACTGGACCAT
CAATCAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCAATTCATCACTGTGAACATCGAAA
CAGCAGGTGCTTGAACCGTAGCTGGCAAGCGGCTTACCGGCTCTCTATGAAAGTGAAGGCAATTC
CTCGCGGAAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTTACCTGGGACTGAGAAATCTGCTGGCTATTTGACTC
GTGGCTACTCGTTAATATCAAGGACGTAAGTGAAGAGGATGCAGGGAATATACAATCTTGGTGGG
ATAAAACAGTCAAATGTGTTTAAAACCTCACTGCCACTCTAATTTCAATGTGAACCGGCACAAAAC
TCACACATGCCACCGTGCACAGCACTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCOCCCAA
AAGCCAAAGGACACCCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTTGAGCCAC
GAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACCGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGCTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGCTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCOCCATCGAGAAAACCATC
TCCAAAGCCAAAGGCGAGCCCGAGAACACAGGTTACACCCCTGCCOCCCATCCCGGGAGGAGATGAC
CAAGAACCAGGTCAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
AGAGCAATGGGACCGGAGAACAACTACAAGACCAGCCCTCCCGTCTGGACTCCGACCGCTCCTTC
TTCCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAGCTTCTCATGCTCCGT
GATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAT

Серый с курсивом: сигнальный пептид; Желтый: Ig-подобный домен 1; Синий: Ig-подобный домен 2;

Серый: Ig-подобный домен 3; Зеленый: Ig-подобный домен 4; Черный с подчеркиванием: фрагмент IgG1-Fc человека

Фиг. 18

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

16/17

V₂₃₄

Аминокислотная последовательность

MVSYWDVGVLLCALLSCLLLTGS SSGI F I SDTGRPFVEMYSEIPEI I HMTEGRELVI PCRVTSPNITV
TLKKFPLDTLI PDGKRI I WDSRKGFI I SNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTNII DVQI S
TPRFVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKKNRASVRRRI DQSN SHAN IFYSVLTIDQM
KDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFPSPEVWMLK
DGLPATEKSARYLTRGYSLLIKDVTEE DAGNYTILLLSIKQSNVFKNIL TAILIVNVKPKDTHICPPCPA
PE LLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNARTKFREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWE SNGQFENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLVTDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNN
YTKSLSLSPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGCTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATC
TAGTTCAGGTATATTATTAGTGATACAGGTAGACCTTTGATAGAGATGTACAGTGAATCCCGAAA
TTATACACATGACTGAAGGAAGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTTACGTACCTAACATCACTGTI
ACTTTAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAA
GGGCTTCAATATCAAAATGCAACGTA CAAA GAAATAGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATG
GGCAATTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAAACCAATACAATCATAGATGTC AAA TAAGC
ACACCACGCCAGTCAAAAT TACT TAGAGGCCATACTCTTGTCCCAATTGTACTGCTACCACTCCCTI
GAACACGAGAGTTCAAATGACCTGGAGTTACCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGAC
GAATTGACCAAAGCAATTC CATGCCAACATATTCTACAGTGTCTTACTATTGACAAAATGCAGAAC
AAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTAAAGGAGTGGACCATCATTCAAATCTGTTAACACCTCAGT
GCATATATATGATAAAGCAATTCATCACTGTGAAACATCGAAAA CAGCAGGTGCTTGAACCCGTAGCTG
GCAAGCGGTCTTACC GGCTCTCTATGAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTGTATGGTTAAAA
GATGGGTTACCTGCGACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTGTGGCTACTCGTAAATATCAAGGA
CGTAACTGAAGAGGATGCAAGGAATTAACAATCTTGCTGAGCATAAAAACAGTCAAATGTGTTAAAA
ACCTCACTGCCACTCTAAATGTCAATGTGAAACCCGACAAAACTCACACATGCCACCCTGCCAGCA
CTGAACTCCTGGGGGACCGTCACTCTTCCCTTTCCCCCAAACCCAAAGGACCCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAAAGCAGC
TACCGTGTGGT CAGCGTCCCTCACCGTCTGCAACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAA
GGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAG
AACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGT CAGCTGACCTGC
CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAA
CTACAAGACCAAGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAAGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCAGGAGGCTCTGCACAAACCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA

Серый с курсивом: сигнальный пептид; Синий: Ig-подобный домен 2; Серый: Ig-подобный домен 3; Зеленый: Ig-подобный домен 4;
Черный с подчеркиванием: фрагмент IgG1-Fc человека

Фиг. 19

ИНГИБИТОРЫ VEGF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ

17/17

V₂₄ Аминокислотная последовательность

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPRVTSFNITV
TLKKFPLDITLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKINYLTHRQNTNIIIDVFIT
VKHRKQOVLETVAGKRSYRLSMKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLIKDVTEEDAGNY
TILLSIKQSNVFNLTATLIVNVKPKDHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSGFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGCTGCTTCTCAGGATC
TAGTTCAGGTATATTATTAGTGATACAGGTAGACCTTTCTGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCGAAA
TTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCAATCCCTGCGGGTTACGTCACCTAACATCACTGTT
ACTTTAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGAAAAAGCATAATCTGGGACAGTAGAAA
GGGCTTCATCATATCBAATGCAACGTACAAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATG
GGCATTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATGCTTTCATCACT
GTGAAACATCGAAAACAGCAGGTGCTTGAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTATGAA
AGTGAAAGCATTTCCCTCGCCGGAAGTGTATGGTTAAAAGATGGGTTAOCCTGCACCTGAGAAATCTG
CTCGCTATTGACTCGTGGCTACTCGTAAATTAACAAGGACGTAACCTGAAGAGGATGCAAGGAAATAT
ACAATCTTGTCTGAGCATAAAACAGTCAAAATGTGTTAAAACCTCACTGCCACTCTAATTTGTCATGT
GAAACCCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCOCAGCAOCTGAACTOCTGGGGGGACCGTCACTCT
TCCTCTTCCCCAAAACCCAGGACAOCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCAOCTACCGTGTGTCAGCGTCTCACCGTCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAAACACAGGTGTACACOCCTGCCCCOATC
CCGGGAGSAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGCCTTCTATCCAGGACACA
TCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAC
TCCGACGGCTCCTCTTCTCTACAGCAAGCTCAOCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAACGT
CTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAAOCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA

Серый с курсивом: сигнальный пептид; Синий: Ig-подобный домен 2; Зеленый: Ig-подобный домен 4;

Черный с подчеркиванием: фрагмент IgG1-Fc человека

Фиг. 20